

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Februar 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/011907 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/705**

97084 Würzburg (DE). HENSEL, Frank [DE/DE]; Am Exerzierplatz 1, 97070 Würzburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02699

(74) Anwalt: PÖHNER, Wilfried; Röntgenring 4, Postfach 63 23, 97070 Würzburg (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:

23. Juli 2002 (23.07.2002)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, CN, IL, JP, RU, US.

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(30) Angaben zur Priorität:

101 36 009.6 24. Juli 2001 (24.07.2001) DE
102 10 425.5 9. März 2002 (09.03.2002) DE

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(71) Anmelder und

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder: MÜLLER-HERMELINK, Hans, Konrad [DE/DE]; Heinrich-Zeuner-Strasse 72, 97082 Würzburg (DE). VOLLMERS, Heinz [DE/DE]; Budapeststrasse 23,

A2

(54) Title: RECEPTOR, THE USE THEREOF, AND MOUSE ANTIBODIES

WO 03/011907

(54) Bezeichnung: REZEPTOR, DESSEN VERWENDUNG SOWIE MAUSANTIKÖRPER

(57) Abstract: The invention relates to a receptor located on the surface membrane of highly proliferative cells, particularly of the gastric carcinoma, which is composed of glycoproteins. At least one determinant of the glycoprotein corresponds with one of the CFR-1 protein, and the human antibody 103/51 and/or the murine antibody 58/47-69 (IgM) specifically binds to the glycoprotein.

(57) Zusammenfassung: Rezeptor auf der Oberflächenmembran von stark proliferierenden Zellen insbesondere des Magenkarzinoms, der aus Glykoproteinen aufgebaut ist, wobei wenigstens eine Determinante des Glykoproteins mit einer des CFR-1 Proteins übereinstimmt und der humane Antikörper 103/51 und/oder der murine Antikörper 58/47-69 (IgM) am Glykoprotein spezifisch bindet.

Rezeptor, dessen Verwendung sowie Mausantikörper

Die Erfindung bezieht sich auf einen an der Oberfläche von stark
5 proliferierenden Zellen insbesondere des Magenkarzinoms befindli-
chen Rezeptor, dessen Verwendung, sowie die Struktur eines spezi-
fisch hieran bindenden Mausantikörpers.

Weithin bekannt ist, für klinische und wissenschaftliche Untersu-
10 chungen von Hybridomen erzeugte monoklonale Antikörper einzu-
setzen. Für die Behandlung von Tumoren, viralen und mikrobiellen
Infektionen, B-Zell-Immundefizienzen mit verringrigerter Antikörperer-
zeugung und andere Störungen des Immunsystems ist die Anwen-
dung humaner monoklonaler, von B-Zell Hybridomen erzeugter Anti-
15 körper vielversprechend.

Beim Magenkarzinom handelt es sich um eine der weltweit häufig-
sten Krebsarten. Nach Lauren „The two histological man types of
gastic carcinoma“, Acta Path Microbiol Scand; 64:331-49, werden sie
histologisch eingeteilt in diffuse Adenokarzinome und intestinale
20 Adenokarzinome. Intestinale Magenkarzome sind oft von chrono-
scher Gastritis B begleitet und insbesondere von intestinalen Me-
taplasien, die als Vorläufer dysplastischer Veränderungen und von
Magenkarzinomen betrachtet werden. Unterschiede zwischen diesen
beiden Arten zeigen sich auch darin, dass Patienten mit Karzinomen
25 des diffusen Typs oft der Blutgruppe A angehören, woraus auf den
Einfluss genetischer Faktoren beim Krebsrisiko geschlossen werden
kann, währen Umweltfaktoren, z.B. eine Helicobacter pylori-Infektion,
möglicherweise für die Entstehung von Karzinomen des intestinalen
30 Typs von Bedeutung sind. Zwar ist eine abnehmende Häufigkeit der
Magenadenokarzinome im Westen festzustellen, dafür treten sie
aber nun vermehrt im Osten auf.

Die Entwicklung von Magenkrebs ist ein mehrstufiger und multifaktorieller Prozeß (Correa, 1992 Cancer Res. 52:6735-6740). Obwohl nur wenig über die molekularen Mechanismen bekannt gelten als Faktoren hohe Salzeinnahmen, Alkohol, Nitrosamine und Infektionen mit den Bakterium Helicobacter Pylori (H. pylori) als nachweislich am Entstehen des Magenkrebses beteiligt. Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen H. pylori Infektionen und dem Vorkommen von Gastritis dysplasi und der Entwicklung von Magenkrebs wurde dieses Bakterium durch die WHO als in die Klasse 1 der kanzerogenen Stoffe gehörend klassifiziert. H. pylori induziert direkt schwerwiegende vorkanzerogene Änderungen der Zellen im Bereich der Schleimhaut und ist ebenfalls verantwortlich für ein Ansteigen der Autoantikörper, die häufig bei Gastritis und Magenkrebspatienten beobachtet werden (Negrini et al., 1996 Gastroenterol. 111:655-665). Diese Antikörper sind in der Lage, Magenlesionen und Apoptose im Magenepithel zu induzieren (Steiniger et al., 1998 Virchows Arch. 433:13-18). Die Natur der Antigene ist teilweise bis heute unbekannt. Antikörper gegen die Magen H+/K(+)-ATPase (Claeys et al., 1998 Gastroenterology 115:340-347), Interleukin-8 (Crabtree et al., 1993 Scand.J.Immunol. 37:65-70; Ma et al., 1994 Scand.J.Gastroenterol. 29:961-965) und das Lewisblutgruppenantigen (Appelman et al., 1997 Trends.Microbiol. 5:70-73) werden häufig bei Magenschleimhaut oder Magenkrebs gefunden.

Die Therapie war bislang auf Gastrektomie und Lymphadenektomie beschränkt, aufgrund der auch dann noch schlechten Prognose besteht jedoch der Bedarf nach einer neuen begleitenden Therapie. Immunologische Studien haben gezeigt, dass auch in Fällen, in denen das Immunsystem maligne Zellen nicht wirksam bekämpfen kann, eine zelluläre und humorale Aktivität meßbar ist, aber nicht ausreicht, um die Tumorzellen zu zerstören. Ein wirkungsvoller An-

satz ist nun der, von der Immunantwort des Patienten stammenden Antikörper zu isolieren, geeignet zu vermehren und therapeutisch einzusetzen. So wurden bsp. von Patienten mit Lungen-, Ösophagus- und Dickdarmkrebs stammende Antikörper isoliert und davon humane monoklonale Antikörper abgeleitet, die z.B. direkt Differenzierung und das Wachstum der Tumorzellen beeinflussen.

Apoptose ist der programmierte Zelltod, Selbstmord von Zellen, durch Fragmentation der DNA, Zellschrumpfung und Dilatation des endoplasmatischen Reticulums, gefolgt von Zellfragmentation und der Bildung von Membranvesikeln, den sog. apoptotischen Körpern. Apoptose, die physiologische Form des Zelltods, garantiert eine schnelle und saubere Entfernung unnötiger Zellen, ohne Entzündungsvorgänge oder Gewebeverletzungen auszulösen wie im Falle der Nekrose. Unter pathologischen Bedingungen dient sie auch zum Entfernen maligner Zellen, wie etwa Krebsvorläuferzellen. Sie kann durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden, wie etwa durch zytotoxische T-Lymphozyten oder Zytokine, wie Tumornekrosefaktor, Glukokortikoide und Antikörper. Sie ist die häufigste Todesursache eukaryontischer Zellen und kommt vor in der Embryogenese, Metamorphose und Gewebsatrophie. Apoptotische Rezeptoren an der Zelloberfläche, wie jene der NGF/TNF-Familie werden prädominant auf Lymphozyten exprimiert, befinden sich aber auch auf verschiedenen anderen Zelltypen, weshalb sie sich nicht für eine Krebstherapie eignen. Insbesondere haben bei in-vivo-Tests Liganden und Antikörper für diese Rezeptoren zu Leberschäden geführt. Deshalb sind tumorspezifische Rezeptoren mit apoptotischer Funktion besonders wichtig.

In jüngsten Publikationen wurde der humane Antikörper 103/51 beschrieben, der von Magenkrebspatienten mit diffusem Adenokarzinom gewonnen wurde und der mit H. pylori und Magenkrebszellen

wechselwirkt (Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-1532). Bei allen Untersuchungen wurde die bekannte Magenadenokarzinom-Zelllinie 23132 verwendet, die unter der Nr. ACC201 bei der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Maschero-
5 der Weg 1b, 38124 Braunschweig hinterlegt ist. Der Antikörper hat in geringen Dosen einen mitotischen Effekt auf Magenkrebzellen in vitro, in dem sie an einen 130 kD Membranrezeptor binden (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235). Durch Sequenzierung der Genbereiche des Antikörpers wurde der Antikörper 103/51 als Auto-
10 antikörper identifiziert. Immunohistochimische Untersuchungen zeigen, daß der Antikörper stark mit Magenkrebzellen und mit Magen- hormonzellen reagiert.

Der zelluläre Rezeptor des monokonalen Antikörpers 103/51 war
15 bisher nicht bekannt. Im Rahmen der zu vorliegenden Erfindung füh- renden Untersuchungen konnte dieser zelluläre Rezeptor identifiziert werden: Diese Identifizierung gestaltete sich jedoch als schwierig. Einerseits reagiert der monoklonale Antikörper 103/51 bei der We- sternblot-Analyse mit seinem Rezeptor nur unter ganz bestimmten
20 Stringenzbedingungen. Andererseits findet man eine durch Denatu- rierungsartefakte hervorgerufene unspezifische Reaktion mit einer Reihe weiterer Proteine.

Sequenzierungen haben gezeigt, daß der Rezeptor Übereinstim-
25 mungen mit dem CFR-1 Protein aufweist, jedoch mit diesem nicht identisch ist. Des weiteren werden damit Glycoprotein-Verbindungen beansprucht, die in einer oder mehreren Determinanten (Liganden) mit denen des bekannten CFR-1 übereinstimmen. Insbesondere wird eine Homologie gefordert, die im Sinne dieser Anmeldung als eine
30 Übereinstimmung von mindestens 80% in den primären Aminosäu- resequenzen zu definieren ist. Der Rezeptor ist demzufolge eine Iso- form zu CFR-1. Zusätzlich ist eine spezifische Bindung entweder an

den humanen Antikörper 103/51 und/oder den murinen Antikörper 58/47-69 gefordert.

5 Von besonderem Interesse ist, wenn die spezifische Bindungsstelle am Glycoprotein ein Carbohydrat-Rest, also ein Zucker-Rest ist.

In spezieller Ausgestaltung weist das CFR-1 Protein als Determinante eine Aminosäuresequenz gemäß Anlage S Zelllinie 23132 auf.

10 Bei dem zellulären Rezeptor des Antikörpers 103/51 handelt es sich um eine für Tumorzellen, insbesondere für Magenkarzinomzellen spezifische Isoform des Proteins CFR-1, die in normalen Gewebe nicht auftritt. Die spezifischen Rezeptoreigenschaften dieser Isoform beruhen auf einer besonderen mit dem Proteinrückgrat über eine N-

15 Verknüpfung verbundenen Glykostruktur. Die tumorspezifische Rezeptor kann in einem Screeningverfahren zur Identifizierung von spezifischen Bindepartnern eingesetzt werden. Spezifischer Bindep-
artner an den Rezeptor sind im Sinne der vorliegenden Erfindung solche Substanzen, die selektiv an eine tumorspezifische Glyko-

20 struktur von CFR-1 binden und vorzugsweise die Fähigkeit zur Apoptoseinduzierung besitzen. Diese spezifischen Bindepartner können für die Herstellung von therapeutischen Mitteln zur Tumorbe- kämpfung sowie zur Herstellung von diagnostischen Mitteln einge- setzt werden.

25 Die Proteinbindung wurde als Isoform des CFR-1 durch Reini- gung, Sequenzierung und Transfektion bestimmt. Die Spezifität für das Antigen 103/51 wird durch Herstellung muriner Antikörper aus gereinigten Molekülen mit identischen Reaktionen und Funktionen bestätigt, durch immunhistochemisches Färben und einer MTT-

30 Untersuchung von zwei CFR-1 negativen Zelllinien. Die Isoform des CFR-1 Moleküls, welches sowohl durch den humanen als auch den

murinen Antikörper festgestellt wurde, ist in den Zellmembranen der Epithelzellen lokalisiert und hat ein Expressionsmuster, das sich von den bisher für CFR-1 beschriebenen unterscheidet (Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol. 12:5600-5609).

5

Das CFR-1, welches aus hochaffinen FGF Bindeprotein (FGF=fibroblast growth factor) aus Hühnerfibroplasten isoliert wurde (Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol. 12:5600-5609), bindet in einer größeren Anzahl an FGFs und dürfte eine Rolle spielen bei der Regulierung der Zellproliferation. In Eizellen chinesischer Hamster (CHO) wurde CFR-1 im Golgi-Apparat (Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol. 12:5600-5609) gefunden, aber es kann ebenso in einer mutierten Form ausgeschieden werden (Zuber et al. 1997 J.Cell Physiol. 170:217-227). In Abhängigkeit vom Organismus wurden zwei Varianten des CFR-1 festgestellt, die Homologien zwischen 80 und 95% mit ESL-1 (= E-selectin-ligand 1) und MG-160 (Membransialoglycoprotein 160) aufweisen (Burrus et al., 1992 Mol.Cell.Biol. 12:5600-5609; Stieber et al., 1995 Exp.Cell.Res. 219:562-570; Steegmaier et al., 1995 Nature 373:615-620; Mourelatos et al., 1996 DNA Cell.Biol. 15:1121-1128) und scheinen keine weiteren Sequenzhomologien mit anderen, soweit bekannten Proteinen aufzuweisen. Die Funktion und der zellulare Aufbau der CFR-1 und deren Homologen ist relativ unbekannt und widersprüchlich. Es konnte gezeigt werden, daß MG-160, welches ein mittleres Golgi sialoglycoprotein dargestellt und aus Rattenhirn gewonnen wurde, eine Rolle im intrazellulären FGF Austausch spielt (Zuber et al., 1997 J.Cell.Physiol. 170:217-227).

Jüngste Resultate haben gezeigt, daß die Lokalisierung dieses Proteins nicht auf den Golgi Apparat beschränkt ist. Dann jedoch, wenn es am c-terminus abgeschnitten ist, kann das Protein an der Plasmamembran und den Filopodia lokalisiert sein (Gonatas et al., 1998 J.Cell.Sci. 111:249-260). Dies stimmt überein mit der Kenntnis, daß

das dritte Homologe, ESL-1, welches aus mausneutrophilen Progenitorzellen isoliert wurde (32Dcl3), sowohl im Golgi-Apparat als auch an der Zelloberfläche von microvilli gefunden wurde (Steegmaier et al., 1997 J.Cell.Sci. 110:687-694; Gonatas et al., 1998 J.Cell.Sci. 111:249-260). ESL-1 wurde als Ligand von E-selectin in neutrophilen Zellen mit einem ungefährten Molekulargewicht von 150 kD identifiziert. Immunpräzipitation mit Anti ESL-1 Antikörpern zeigen, daß eine nicht näher definierte Isoform dieses Proteins aus verschiedenen Zellen ausgefällt werden können, einschließlich einiger Krebszelllinien (Steegmaier et al., 1995 Nature 373:615-620).

Aufgrund der überwiegend in den Membranen von Krebszellen liegenden Vorkommen des CFR-1, ist der Schluß zu ziehen, daß der beschriebene Rezeptor eine Isoform des CFR-1 ist. Eine abweichende Zellverteilung von CFR-1 und seiner Homologe ist wahrscheinlich für die oben genannten Resultate verantwortlich und ist ein bekanntes Phänomen für andere Proteine (Smalheiser, 1996 Mol.Biol.Cell 7:1003-1014). Eine abweichende Verteilung kann durch ein abweichendes Glycosilierungsmuster in malignen Zellen verursacht werden, die zu einem Transport zu den Plasmamembranen führen.

Die Gewebeverteilung zeigt, daß das CFR-1 Molekül mit aktivierten und prolierierenden Zellen in Verbindung steht, wie durch Anfärben mit dem Antikörper Ki67 gezeigt wurde (Ramires et al., 1997 J.Pathol 182:62-67). Die normale Magenschleimhaut zeigt diesen Rezeptor nicht in meßbarem Umfang, aber die mit H. pylori infiltrierte Epithelien oder displastische Epithelien weisen dieses Antigen auf. Beide Gewebe sind proliferativ und können Vorgänge für den Magenkrebs sein.

30

Für das Verständnis der hohen Wirksamkeit entscheidend ist, daß sich im Gegensatz zur Struktur des CFR-1, die sich auch auf gesun-

den Zellen findet, die ermittelte Isoform sich nicht auf gesunden sondern ausschließlich auf stark proliferierenden Zellen findet, Zellen also, die sich stark teilen, wie beispielsweise die im Wachstum befindlichen Tumorzellen sowie entsprechender Vorläuferstufen. Die
5 Wirkungsweise des Rezeptors beruht im wesentlichen darauf, daß er als Energierezeptor der Nahrungsaufnahme der Zellen dient und insbesondere bei Zellen mit häufiger Teilung, zu denen die Karzinomzellen zählen, einen dominierenden Anteil aufweisen. Ausdrücklich anzumerken ist, daß dieser Rezeptor nicht nur bei Magenkarzinomen
10 Anwendung finden wird, sondern auch bei allen epithelialen Tumoren, die im wesentlichen gleiche Reaktionsmechanismen aufweisen. Hinausgehend über Magentumore wurde die Existenz dieser Rezeptoren in kanzerogenen Gewebe folgender Tumore nachgewiesen:
15 Speiseröhre, Magen, Darm, Rektum, Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse, Lunge, Bronchien, Brust, Cervix, Prostata, Cardia, Barrett, Eierstock und/oder Uterus. Die tumorwirksamen Antikörper, die an den erfindungsgemäßigen Rezeptor andocken, wirken also gezielt wirksam an den kanzerogenen (und nicht den gesunden) Zellen.
20 Die Glycoproteine der Rezeptorstruktur können über deren Molekulargewicht von etwa 130 kD identifiziert werden, wobei sich das Molekulargewicht in einer der bekannten Weise, so z. B. mittels der Gelelektrophorese ermittelt werden kann. Der Begriff „etwa“ bezieht sich darauf, daß für einen Fachmann erkennbar ist, daß derartige Größenbestimmungen keinesfalls exakt sind, sondern Veränderungen oder Variationen der Methoden der Molekulargrößebestimmungen zu Schwankungen in der Meßwerten führen.
25 Das bedeutendste Anwendungsgebiet des Rezeptors ist das der Diagnose und Therapie. Bei der prophylaktischen Anwendung wird der Rezeptor dem Patienten in pharmazeutischen Dosen verabreicht,
30 mit dem Ziel der Stimulierung von Antikörpern, so daß sich im Er-

gebnis eine Vaccinierung mit Hilfe des Rezeptors erreichen lässt. Die Antikörper tragen Sorge dafür, etwaig entstehende Tumorzellen zu beseitigen.

5 Aber auch die Verabreichung des Rezeptors bei bereits vorhandenen Tumorzellen ist eine Möglichkeit der Medikation. Die verabreichten Rezeptoren unterstützen und verstärken die Antikörperbildung und sorgen folglich für eine erhöhte Apoptose der Tumorzellen oder für eine komplettvermittelte Lyse. Die Zelle „verhungert“, da eine 10 Blockierung des Rezeptors zu einem Wachstumsstillstand führt.

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich der Rezeptor insbesondere zur Bekämpfung der nachfolgend genannten Tumorvorstufen nachweislich eignet. Im Hinblick auf die Erkrankungen des Magens eignet sich der Rezeptor zur Bekämpfung der 15 Dysplasie der Magenschleimhaut und/oder der intestinalen Metaplasie des Magens und/oder der Bekämpfung einer Magenschleimhautentzündung, die mit dem Bakterium Helicobacter pylori assoziiert ist sowie zur Bekämpfung tubulärer und tubulovillöser Adenome des 20 Magens.

Eine Anwendung ist insbesondere auch bei folgenden Erkrankungen des Dickdarms angezeigt, nämlich der tubulären Adenome des Dickdarms, der villösen Adenome des Dickdarms und der Dysplasie bei Collitis ulcerosa.

25 Der Rezeptor ist gleichermaßen geeignet bei Barrett-Dysplasie und der Barrett-Metaplasie der Speiseröhre.
Auch zur Bekämpfung der nachfolgend genannten Erkrankungen des Gebärmutterhalses ist der Rezeptor geeignet:
Der cervicalen intraepithelialen Neoplasie I, der cervicalen intraepithelialen Neoplasie II und der cervicalen intraepithelialen Neoplasie 30 III.

Schließlich eignet sich der vorbeschriebene Rezeptor auch zur Anwendung bei Plattenepithel Metaplasie und Plattenepithel Dysplasie des Bronchus.

5 Aufgrund der vorbeschriebenen Wirkmechanismen eignet sich der Rezeptor grundsätzlich zur Bekämpfung von Tumoren der Speisröhre, des Magens, Darms, der Rektums, der Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse, Lunge, Bronchien, Brust, Cervix, Prostata, Cardia, Barrett, Eierstock und/oder Uterus.

10 Die Verwendung des Rezeptors zu Diagnosezwecke nutzt die Bindefähigkeit der Antikörper an diesem Rezeptor aufgrund der spezifischen Antigen/Antikörper-Wechselwirkung. Auf diese Weise lässt sich über die Bindungsfähigkeit an den Rezeptor ein Nachweis für die Existenz, die Lokalisierung und/oder die Menge der entsprechenden Antikörper führen. Nach den gleichen Reaktionsmechanismen ist 15 über die Bindefähigkeit ein Nachweis des Rezeptors möglich.

20 Insbesondere dann, wenn die Antikörper Tumorantikörper sind, können sie zum Nachweis für die Existenz von Tumoren genutzt werden. Insbesondere ist es möglich, den Rezeptor als Tumormarker zu nutzen.

25 In einer Weiterbildung kann der Rezeptor zur Herstellung eines Antitumormittels genutzt werden, in dem potentiell antitumorwirksame Substanzen auf ihre spezifische Bindefähigkeit an den Rezeptor untersucht werden und bei positiven Ergebnis, d.h. bei Eingehen einer Bindung, diese Substanz für die pharmazeutische Anwendung genutzt wird. Selbstverständlich ist eine entsprechende Konfektionierung 30 und die Beigabe üblicher Zuschlagsstoffe zur Herstellung des in den Verkehr gelangenden Pharmazeutikums in der üblichen Weise erforderlich.

Ausdrücklich klarzustellen bleibt, daß für die Herstellung von Antitumorarzneien unter Zuhilfenahme des Rezeptors im vorbeschriebenen Sinne nicht nur humane Antikörper in Frage kommen, sondern auch Mausantikörper und/oder humanisierte Antikörper beliebiger Spezies. Gleichermäßigen gilt dies für Antikörperfragmente wie z. B. Fab und F(ab)₂ und/oder Fab'-Fragmente, wie sie durch die proteolytische Spaltung von Antikörpern erhalten werden. Hierzu zählen weiterhin Einzelstrangantikörper und/oder tetramere und/oder dimere Antikörperform und/oder bispezifische Antikörper.

Weiterhin ist bekannt, dass humane Tumorantigene, die in Mäusen immunogen sind, zur Erzeugung monoklonaler Mausantikörpern verwendet werden, und die in der Lage sind, das humane Antigen spezifisch zu erkennen und deshalb geeignet sind, bei Menschen therapeutisch verwendet zu werden.

Aufgabe der zugrundeliegenden Erfindung ist die Ermittlung der Rezeptorstruktur sowie deren Verwendung. Allerdings ergibt sich das Problem, dass die wiederholte Injektion von „fremden“ Antikörpern bsp. Mausantikörpern in Menschen sowohl zu nachteiligen Hypersensibilitätsreaktion sowie erhöhten Clearance-Rate der zirkulierenden Antikörpern führen, sodass die Antikörper ihre Zielstelle nicht erreichen.

Aus diesen Gründen bedarf es eine Überprüfung der therapeutischen Verwendbarkeit von Mausantikörpern. Dessen ungeachtet ist die Verwendbarkeit im Zusammenhang mit diagnostischen Verfahren uneingeschränkt. Auch besteht die Möglichkeit, humanisierte Mausantikörper abzuleiten und zu therapeutischen Zwecken zu nutzen. Auch hier ist entscheidend, daß nicht nur die bereits vorliegen-

den Tumore sondern auch präkanzerogene Strukturen mit Hilfe dieser Diagnoseverfahren ermittelbar sind.

Neben dem vorbeschriebenen Rezeptor wird weiterhin Schutz beansprucht für einen spezifisch hieran bindenden Mausantikörper, dessen Struktur durch die Anlagen A, B definiert ist. Die für alle Antikörper identischen Regionen wurden nicht wiedergegeben; beansprucht und dargestellt wurden jene für den individuellen Antikörper charakteristischen Regionen.

Im Ergebnis erlaubt es der in seiner Struktur beschriebene Rezeptor, der als Isoform zu CFR-1 zu bezeichnen ist, eine Therapie und Diagnose nicht nur von Tumoren sondern auch präkanzerogene Strukturen. Darüber hinaus wird ein spezifischer hieran bindender Mausantikörper in seiner Struktur beschrieben.

20

Materialien und Methoden

Zellkultur und Antikörperreinigung

Für alle Untersuchungen wurde die bekannte Magenadenokarzinom-Zelllinie 23132 (Hensel et al. 1999, Int.J.Cancer 81:229-235) verwendet. Die Zellen wurden bis zu 80% Konfluenz in RPMI-1640 (PAA, Wien Österreich) ergänzt mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin (1% für beide) gezüchtet. Für die beschriebenen Untersuchungen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA getrennt und zweifach mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) vor Benutzung gewaschen.

Die menschliche Hybridomazelllinie 103/51 wurde gewonnen und gezüchtet wie beschrieben in Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-1532. Die Reinigung der IgM Antikörper wurde in der Weise vorgenommen wie anderweitig bereits beschrieben (Vollmers et al., 1998 Oncol.Rep. 5:549-552).

5

Präparation von Membranauszügen

Die Isolierung der Membranproteine aus Tumorzellen wurde in der Weise, wie sie durch Hensel et al. (Hensel et al., 1999, Int.J.Cancer 81:229-235) beschrieben wurde, unter Benutzung der Zelllinie 23132 durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurden die zusammenhängenden Tumorzellen zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgelöst und zentrifugiert, und in einem hypotonischen Puffer (20 mM HEPES, 3 mM KCl, 3mM MgCl₂) aufgelöst. Nach einer 15 Min. Inkubationszeit auf Eis und einer Ultraschallbehandlung für 5 Min., wurden die Kerne durch Zentrifugieren bei 10.000 g für eine Dauer von 10 Min. pelletiert. Das Supernatant wurde für 30 Min. bei 100.000 g in einem Swing-out rotor zentrifugiert und hierdurch die Membran pelletiert. Nachdem die Pellets mit dem hypotonischen Puffer gewaschen wurde, wurden sie in einen Membran Lysis Puffer (50 mM HEPES pH 7.4, 0,1 mM EDTA, 10% Glycerol, and 1% Triton X-100) erneut aufgelöst. Ein Protease Inhibitor (Boehringer, Mannheim, Deutschland) wurde allen Lösungen zugeben.

10

15

20

25

Western blotting:

30

Die Auftrennung durch 10 %ige SDS-PAGE Gele und Western blotting der Proteine wurden unter Standardbedienungen, wie anderweitig beschrieben (Hensel et at., 1999, Int.J.Cancer 81:229-235),

durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurden die geblotteten Nitrozellulose -Membrane mit PBS blockiert, welches 2 % Magermilchpulver enthielt, dem eine einstündigen Inkubation mit 10 µg/ml gereinigtem Antikörper 103/51 folgte. Nach dreimaligem Waschen mit
5 PBS + 0,05% Tween-20 wurde der zweite Antikörper (Peroxidase gekoppelte Hasen antihumane IgM Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland)) inkubiert. Die Reaktion wurde mit Hilfe des Supersignal Chemilumineszenz kits von Pierce (KMF, St. Augustin, Deutschland) nachgewiesen.

10

15

Reinigung des Antigen 103/51

Die Reinigung des Antigens wurde mit Säulenchromatographie unter Verwendung einer Pharmazia (Freiburg, Deutschland) FPLC Einheit durchgeführt. Für die Größenausschluß-Chromatographie wurde eine Pharmazia Superdex 200 (XK 16/60) Säule mit 5 mg des Membranpräparates geladen und mit einem Puffer A betrieben (100 mM Tris/Cl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 40mM NaCl, 1% Triton X-100). Dann wurde das Eluat fraktioniert und durch Western blot Analyse auf Reaktionen mit Antikörpern 103/51 untersucht. Die positiven Fraktionen wurden auf einer MonoQ (5/5 Säule) unter Verwendung des Puffers A gegeben. Die gebundenen Proteine wurden mit Hilfe eines linearen Gradienten unter Verwendung des Puffers B (100 mM Tris/ Cl, pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% Triton X-100) ausgewaschen, fraktioniert und mit Coomassiegefärbtem SDS-PAGE and Western blot Analyse untersucht. Die positiven Banden wurden aus dem Gel getrennt und sequenziert oder zur Immunisierung von Mäusen genutzt.
20
25
30

MALDI peptide Aufzeichnung

5 Die interessierenden Banden wurden herausgetrennt und in kleine Stücke von etwa 1mm x 1mm zerschnitten. Die Gelstücke wurden gewaschen, mit DTT reduziert, S-Alkyliert mit Iodoacetamid und In-Gel aufgelöst mit Trypsin (unmodifiziert, Sequenzgrad, Boehringer) wie anderweitig beschrieben (Shevchenko et al., 1996b Anal.Chem. 68:850-858). Nach 3 Stunden der Verdauung bei 37°C wurden 0.3 µl der Lösung entfernt und einer MALDI peptid Massenspektrometrie auf einem Bruker Reflex MALDI-TOF unterzogen, welches mit einer nachträglichen Extraktion (Bruker, Franzen, Bremen, Deutschland) ausgerüstet war. Die Dünnpfilmtechnik wurde zur Probenpräparierung angewendet (Jensen et al., 1996 Rapid.Commun.Mass.Spectrom 10:1371-1378). Die tryptischen Peptid-Massen wurden dazu verwendet, um nicht redundante Proteinsequenzdaten durch ein Peptid-Suchprogramm, das im Hause entwickelt wurde, zu suchen.

20

Klonen des CFR-1 Antisense-Vektor und Transfektion

RNA Isolierung, cDNA Synthese und PCR wurden wie beschrieben (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurde für die Amplification von PCR aus einem 897 bp Fragment aus einem Bereich von 802 bis 1699 Basenpaare folgende Primer benutzt: CFR-für 5'
GCTTGGAGAAAGGCCTGGTGAA 3', CFR-Rev 5'
TGGCACTTGCGGTACAGGACAG 3'. Die Amplification wurde mit 25 folgendem Zyklusprofil durchgeführt: 95°C, 2 Min; nachfolgend 35 Zyklen bei 94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C 60 sec. und abschließend 72 °C, 4 min. Die Klonierung in den pCR- Skript Amp SK (+)

Vektor und das Sequenzieren der DNA wurde wie früher schon beschrieben (Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) durchgeführt. Der Insert wurde in den pHook-2 Vektor (Invitrogen, Leek, Niederlande) subkloniert und das Klonen wurde erneut durch Sequenzierung überprüft.

Die Transfektion der Zelllinie 23132 mit pHook2-anti CFR-1 wurde mit einem Primefaktor Reagenz (PQLab, Erlangen, Germany) entsprechend dem Lieferantenhandbuch vervollständigt. In Kürze, dass Plasmid DNA wurde auf 10 µg/ml verdünnt und das Primefaktorreagenz im Verhältnis 1:10 einem serumfreien Wachstumsmedium beigegeben. Die verdünnte Plasmid DNA (450 µl), das verdünnte Primefaktorreagenz ergänzend (90 µl) und das serumfreie Wachstumsmedium (460 µl) wurden vermischt und bei Raumtemperatur inkubiert. 60 ml Zellkulturschalen (70% konfluent) wurden zweimal mit dem serumfreien Wachstumsmedium gewaschen und anschließend die Primefaktor/DNA-Mischung tropfenweise hinzugegeben. Die Zellen wurden inkubiert für 18 Stunden bei 37°C and 7% CO₂, anschließend wurde das serumfreie Wachstumsmedium ersetzt durch ein Wachstumsmedium mit 10% FCS und die Zellen wurden weitere 24 Stunden inkubiert, bevor die Expression der CFR-1 Struktur untersucht wurde.

Durchflusszytometrie

Die Zelllinie 23132 wurde von den Kulturplatten durch Trypsin /EDTA 48 Stunden nach der Transfektion abgelöst, gewaschen und anschließend auf Eis mit dem Antikörper 103/51 oder dem humanen Isotyp-kontrol Antikörper (Chromopure human IgM) für 15 min. inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit einem FITC-gekoppelte Hasen Anti-Human IgM Antikörper (Dianova) für 15 Min. auf Eis. Die Antikörper wurden optimal in der 0,01% Natriumazid PBS enthalten ver-

dünnt. Die Zellen wurden mit Durchflusszytometrie (FACScan; Becton Dickinson, USA) analysiert.

5

Glycosidaseassays

Abgelöste und gewaschene Zellen werden erneut in RPMI-1640,
10 welches 10% FCS enthält, suspendiert und für 1 Stunde auf Eis inkupiert, anschließend gezählt und die Cytospins präpariert. Nach Lufttrocknung, Acetonfixierungen der Cytospins Präparate (10 Min), gewaschen, inkubiert mit 20 µU/ml O-Glycosidase oder 5 mU/ml N-Glycosidase (Boehringer) für 4 Stunden bei 37°C. Anschließend
15 wurden die Objektträger gewaschen und immunhistochemisch gefärbt.

Für die Deglycosylation der Membran-Proteine wurden die Membranextrakte für 16 Stunden bei 37°C mit 1 mU/ml N-Glycosidase, verdünnt in Deglycosylation Puffer (50 mM POO-Buffer, pH 7,4) inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Extrakte mit Deglycosylation Puffer allein inkubiert. Dann wurden die Extrakte durch SDS-PAGE separiert und die Western blots, wie oben beschrieben, durchgeführt.
20

25

Herstellung murine monoklonaler Antikörper

BALB/cMäuse wurden zweimal innerhalb 17 Tage mit 5 µg gereinigten Antigen des Antikörpers 103/51 immunisiert, und 4 Tage nach der zweiten Immunisierung getötet. Die Milz wurde mechanisch entfernt und mit 1×10^7 NSO Zellen, wie früher schon beschrieben (Vollmers et al., 1985 Cell 40:547-557), verschmolzen. Die Antikörper produzierenden Hybridome wurden durch immunohistochemi-
30

sche Färbung und der Reaktion in der Western blot Analyse getestet. Der Klon 58/47-69 mit positiver Reaktion wurde für die weiteren Experimente genutzt.

5

Immunohistochemisches Färben der Paraffin Sektionen

In Paraffin eingebettete menschliche Magenschleimhaut mit Tumorzellen wurde zerkleinert (5µg), entparaffiniert, und blockiert mit BSA (15 mg/ml), welches in PBS verdünnt ist, für 30 Min. Die Sektionen wurden inkubiert mit dem Überstand der Hybridoma Zellen 103/51 oder 58/47-69, Ki 67 (Loxo, Dossenheim, Deutschland) oder Mausanti-cytokeration 8 Antikörper, verdünnt auf 1:15 mit BSA/PBS (Dako, Hamburg, Deutschland) für 2 Stunden in einem feuchten Inkubator. Anschließend wurden sie dreimal Tris/NaCl, gewaschen, gefolgt durch eine Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Hasen antihuman oder Hasen Antimaus-Konjugate (Dako), verdünnt auf 1:50 in PBS enthaltend ein Hasenserum (für den Antikörper 103/51) oder in PBS enthaltend menschliches AB Plasma (für Antikörper 58/47-69 und Anti-Cytokeratin). Nach dreimaligen Waschen mit Tris/NaCl und Inkubation in PBS für 10 Min. wurde das Färben mit Diaminobenzidine (0,05%)-Hydrogen Peroxyd (0.02%) für 10 Min. bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion wurde unter laufendem Wasser gestoppt und die Sektionen wurden mit Hematoxylin gegengefärbt.

30

Immunohistochemisches Färben von lebenden und Aceton fixierten Zellen

Für das Färben lebender Zellen wurden die Zellen herausgelöst, gewaschen und verdünnt auf 1×10^6 Zellen pro ml. 1 ml der Zelllösung werden bei 1.500 g für 5 Min. zentrifugiert. Der auf 40 µg/ml mit vollständigen RPMI verdünnte Antikörper wird zu einem Endvolumen von 1ml ergänzt und für 90 Min. auf Eis inkubiert. Dann werden die Zellen bei 1.500 g für 5 Min. pelletiert und wieder aufgelöst mit 500 µl RPMI. Mit 200 µl der Zelllösung werden die Zytospinpräparate präpariert und für 30 Min luftgetrocknet. Die Zellen werden in Aceton für 30 Min. fixiert und dreimal mit Tris/NaCl gewaschen. Die HRP-gekoppelten Hasen antihumanen IgM (DAKO) werden 1:50 in PBS/BSA (01,%) verdünnt und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wird das Färben, wie oben erwähnt, durchgeführt.

Für das Färben der azeton-fixierten Zellen werden die Zytospins präpariert, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und, wie oben beschrieben, in Azeton fixiert. Dann werden die Zytospins für 15 Min. mit PBS/BSA (0,1%) blockiert und für 30 Min. mit 10 µg/ml primärer Antikörper inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern und das Färben wird, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Die MTT- Untersuchung der bekannten Zelllinie 23132 wurde wie beschrieben (Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-1532) durchgeführt. Verkürzt wiedergegeben wurden die trypsinisierten Zellen mit Wachstumsmedium auf 1×10^6 Zellen/ml verdünnt und eine 50 µl Zellsuspension wurde jeder Vertiefung einer 96-Loch Zellkulturplatte

zugegeben. Dann wurden 50 µl der Antikörper, verdünnt in den angegebenen Konzentrationen mit Wachstumsmedium, zu diesen Vertiefungen addiert und die Platten wurden für ein oder zwei Tage bei 37° C in einen feuchten Inkubator inkubiert. Zur Messung wurden 50 µl auf MTT (3(4,5 Dimethylthiazol)-2,5 Diphenyltetrazolium bromid) Lösung (5 mg/ml) in jede Vertiefung gegeben und die Platten wurden für 30 Min. inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten bei 800 g für 5 Min. zentrifugiert, die MTT Lösung entfernt und das gefärbte Zellpellet in 150 µl Dimethylsulphoxid auflöst und die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm und 690 nm gemessen.

Methoden zur Bestimmung der Sequenz von CFR-1

Die Präparation von RNA für die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kits von Quiagen. Zur Vorbereitung wurden 1×10^6 Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1.000 x g für 5 min pelletiert und entsprechend der Herstellerbeschreibung die RNA präpariert. 5 µg RNA (1-5 µl Lösung) wurden mit 1 µl Oligo-dT₁₅ (1 µg/µl) und 2 µl random primer (40 µM) gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 8 µl mit H₂O aufgefüllt. Es erfolgte die Denaturierung der RNA für 10 min bei 65°C und anschließend die Abkühlung der Probe auf Eis. Zu dieser wurden dann 17 µl Mastermix, bestehend aus 5,2 µl DEPC-H₂O, 5 µl 5fach Reverse-Transkriptase-Puffer, 2,5 µl dNTPs (je 10 mM), 2,5 µl DTT (250 mM), 0,8 µl RNasin (400 U) und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U) pipettiert. Die Synthese der cDNA erfolgte für 70 min bei 37°C und wurde anschließend durch eine Erhitzung auf 95°C für 5 min abgebrochen. 1-5 µl der cDNA wurden mit dem PCR-Mastermix gemischt und auf 25 µl Gesamtvolumen mit H₂O aufgefüllt. Der PCR-Mastermix besteht aus 2,5 µl 10fach Taq-Polymerase-Puffer, 0,5 µl 10 mM NTPs, 1,5 – 2 µl 25 mM MgCl₂, je 0,5 µl 20 pM 3' bzw. 5' Primer und 0,2 µl Taq-

Polymerase (1U). Die Amplifikationsbedingungen für die verschiedenen PCR-Produkte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Übersicht der zur Ampflikation der verschiedenen cDNAs verwendeten PCR-Programme

	Produkt	Annealing in [°C]	MgCl ₂ [mM]	Extensionszeit [sec]	Zyklen	Produktgröße [bp]
10	Fragment 1	55	1,75	45	40	691
	Fragment 2	60	1,5	45	40	898
	CFR Fragment 3	55	2,0	45	40	739
	Fragment 4	55	2,0	45	40	941
	Fragment 5	55	2,0	45	40	750

Primer-Sequenzen

Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide

20

CFR

CFR-For 1	5'	OGC AGC TTC AGC AGC AAC AGC A	3'
CFR-Rev 1	5'	CAG CTC AGC CAC CCG GAG AAT G	3'
CFR-For 2	5'	GCT TGG AGA AAG GCC TGG TGA A	3'
CFR-Rev 2	5'	TGG CAC TTG CGG TAC AGG ACA G	3'
CFR-For 3	5'	GAA CAC CGT CTC TTA GAG CTG C	3'
CFR-Rev 3	5'	GCT TCC TGC AGA GTG TCA TTG C	3'
CFR-For 4	5'	GGA GGA CGT GTT GAA GCT TTG C	3'
CFR-Rev 4	5'	CCA GGG CAC AAG CAG TAT GAA G	3'
CFR-For 5	5'	CAA CAG CAG ACA GGT CAG GTG G	3'
CFR-Rev 5	5'	CCG GAA GTT CTG TTG GTA TGA G	3'

30

Die Sequenzierung erfolgte mit einem Sequenzierautomaten der Firma AppliedBiosystems. Für die Sequenzierung klonierter PCR-Produkte wurden die folgenden Oligos verwendet:

35

T ₃	5'	ATT TAA CCC TCA CTA AAG GG	3'
T ₇	5'	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	3'

5 3 µl Plasmid-DNA, isoliert wie unter 2.4.15. beschrieben, wurden mit
1 µl Primer (3,2 pM), 11 µl H₂O und 5 µl Reaktionsgemisch des Abi-
Prism Sequencing Kits gemischt und im Thermocycler für 25 Zyklen
mit den folgenden Parametern inkubiert:

	<u>Denaturierung</u>	<u>Annealing</u>	<u>Extension</u>
10	95°C, 30 sec	52°C, 15 sec	60°C, 4 min

15 Zum Entfernen von Oligos und dNTPs wurde das Reaktionsgemisch
über eine Sephadex G-50 Säule gereinigt. Hierzu wurde eine 100 µl
Pipettenspitze bis zum oberen Rand mit Säulenmaterial beladen und
für 3 min bei 2.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe
aufgegeben und das Säulchen nochmals zentrifugiert. Die DNA wur-
de dann durch 2 µl Na-Azetat (pH 5,2) und 50 µl 100% Äthanol aus-
gefällt und durch eine Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 min pelle-
tiert. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 3 µl Formamid/25 mM
20 EDTA (5:1) aufgenommen und im Sequenzierautomaten analysiert.

Auswertung der Sequenzierungen

25 Von allen Klonierungen wurden mindestens fünf Klone sequenziert.
Um Fehler zu beseitigen, die bei der Amplifikation mit der Taq-
Polymerase bzw. der Sequenzierung entstanden sind, wurden die
Sequenzen der klonierten PCR-Fragmente mit Hilfe der DNAsis für
Windows Software untereinander verglichen und eine Konsensus-
30 Sequenz aller Klone aus beiden Leserichtungen erstellt. Durch Um-
schreiben der DNA-Sequenzen in Aminosäure-Sequenzen wurde
dann die Anzahl der stillen Mutationen und der Aminosäure-

austauschmutationen bestimmt. Die Sequenzen für MG160 und CFR wurden aus der NCBI-Datenbank bezogen und mit dem DNAsis für Windows Programm mit Sequenzierungen der PCR-Produkte verglichen.

5

Figuren und Tabellen

Figur 1: Identifizierung des Antigens des Antikörpers 103/51

a) Proteinreinigung des Antigens aus Membranextrakten der Magen-
10 krebszelllinie 23132. Die Membranfraktionen werden chromatogra-
phisches Verfahren unterworfen und Ganzmembranfraktionen (Reihe
2) oder gereinigte Proteine (Reihe 3) werden mit Coomassie einge-
färbt (Reihe 1 : 10 kDa Tabelle). Die Western Blot Analyse mit dem
Antikörper 103/51 auf Membranfraktionen der Zelllinie 23132 ange-
15 wendet zeigt eine Reaktion mit einem Protein mit Molekulargewicht
von näherungsweise 130 kD (Reihe 4). Spezifitäten der gereinigten
Membranextrakte wurde durch Westernblotting mit 103/51 kontrolliert
(Reihe 5). Das durch einen Pfeil gekennzeichnete Protein wurde aus
präparativem Gel gewonnen und für MALDI Massenspektromtrie und
20 die Immunisierung von Mäusen genutzt.

b) Identifizierung der 130 kDa gelseparierten Proteine durch hoch-
auflösende MALDI peptid Massenspektrometrie. Die mit „*“ bezeich-
neten Spitzen geben die berechneten Massen der tryptischen Pepti-
de des U28811 humanen systemreichen fibroblast growth factor re-
25 ceptor (CFR-1) mit einer Massengenaugigkeit von mehr als 50 ppm
wider. Die mit „T“ bezeichneten Spitzen entsprechen den Autolyse-
produkten des Trypsin. Der Einschub zeigt eine Massenauflösung
($m/\Delta m = 9000$) der Spitzen bei m/z 1707.818.

30

Figur 2: Einfluß der CFR-1 Antisense-Transfektion auf Färbungen von Antikörpern 103/51 und Lebendzellfärbung (Vergrößerung 200x).

- a) Die Zelllinie 23132 wurde mit Kontrollvektor vorübergehend transfiziert und die Azetonfixierung zeigt eine intensive Färbung mit Antikörper 103/51.
- b) Eine reduzierte Einfärbung von kurz mit CFR-1 Antisensevektor transfektierten Zellen ist sichtbar.
- c) Um den Hintergrund im immunhistochemischen Färbungen zu verringern, wurden Lebendzelle der Zelllinie 23132 eingefärbt. Eine deutliche Membranfärbung ist sichtbar.
- d) Zur Kontrolle eine Lebendzellfärbung (nur sekundäre Antikörper) der Zelllinie 23132.
- e) Das negative Lebendzellfärbung der Zelllinie Colo-699 mit dem Antikörper 103/51 zeigt, daß diese Zelllinie für CFR-1 negativ ist.
- f) Zur Kontrolle Lebendzellfärbung (nur sekundäre Antikörper) mit der Zelllinie Colo-699.
- g) Durchflußzytometrie mit der Zelllinie 23132 mit Antikörpern Chomopur human IgM (grau) und 103/51.
- h) Analyse von Zellen, die mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 transfiziert sind, mit Durchflußzytometrie 48 Stunden nach der Transfektion.
- i) Zellen, die mit dem CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert sind, zeigen einen deutlichen Abfall in der Bindung des Antikörpers 103/51.

25

Figur 3: Einfluß der Deglycosylation auf die Färbung mit Antikörper 103/51

- a) Zellen (23132) mit Deglycosylationspuffer inkubiert und Azeton fixiert zeigen eine intensive Färbung mit Antikörper 103/51.

30

b) Zellen (23132), die mit N-Glycosidase behandelt und anschließend Azeton fixiert wurden, zeigen eine deutliche Verringerung der Färbung.

5 c) Der Einfluß des Declysylation auf Membranextrakte der Zelllinie 23132 in Reaktion mit dem Antikörper 103/51 in Westernblot-Analyse. Die für 16 Stunden mit Declysylationspuffer (Puffer) inkubierten Extrakte zeigen keinen Unterschied im Färben im Vergleich zu unbehandelten Extrakten (Kontrolle). Die Inkubation mit N-Glycosydase führt zu einer deutlichen Verminderung im Färben (N-Glyco).

10

Figur 4: Immunhistochemische Färbung mit murinen Antikörpern 58/47-69 und 103/51 auf Magenadenokarzinomen

15 Um identische Spezifität des Antikörpers 103/51 und des murinen Antikörpers 58/47-69 zu zeigen, wurde Magenadenokarzinomzellen vom diffusen Typ eingefärbt mit Hämatoxilin-Eosin (a), Antikörpern 103/51 (b) und 58/47-69 (c), und Antizytokeratin 18 als positive Kontrolle. Die identische Färbung in c und d zeigt identische Spezifität (Pfeile = Tumorzellen).

20

Figur 5: Immunhistochemische Färbung des Antikörper 103/51 auf verschiedenen Magengeweben

25 Cryosektionen von Magengeweben werden mit HE, Antikörper Ki67 (um die proliferierenden Zellen anzuzeigen) und Antikörper 103/51 gefärbt (Vergrößerung x100)

a) Magengewebe mit Entzündungen

b) H. pylori induzierte Gastritis (die Einschübe zeigen eine Vergrößerung der markierten Drüsen)

30 c) Dysplasi

d) Magenadenokarzinom

Figur 6: Immunhistochemisches Färbung mit Antikörper 103/51 auf verschiedenen kanzerogenen und normalen Geweben

Das Färben der Antikörper 103/51 wird bei folgenden Geweben gezeigt: Karzinom des Vater-Gefäßes (a), lobulär invasives Brustkarzinom (b), Adenokarzinom des Darms und keine Färbung der normalen Becherzelle der Darmschleimhaut (c), Leberzellenkarzinom (d), glomerulare und fasciculare Bereiche der Nebennierenrinde (e), Sammelgefäß der nierenspezifischen Färbung des Golgi-Apparates (Pfeil) (f). Die Pfeile in a - d zeigen Tumorzellen, der rote Pfeil in (c) = Becherzellen, der Pfeil in (f) deuten den Golgi-Apparat an (Vergrößerung 400x, mit Ausnahme (g) 200x).

15

Figur 7: Stimulation der Zelllinien mit Antikörpern 103/51 und 58/47-69 durch kolorimetrische MTT-Untersuchung bestimmt

a) Die Titration mit gereinigtem Antikörper 103/51 zeigt ein Anwachsen der Stimulation bis zu 4 µg/ml. Höhere Konzentrationen führen nicht zu einer höheren Stimulation (c = Control, keine Zugabe von Antikörper).

b) Eine MTT-Untersuchung mit gleichen Konzentration (4 µg/ml) von gereinigten Antikörpern 103/51 und 58/47-69 zeigen vergleichbare Stimulationen der Tumorzelllinien 23132 nach ein oder zwei Tagen Inkubation (Kontrolle 1 = Chrompur humanes IgM, Kontrolle 2 = unkorreliertes Maus IgM).

c) Die Zelllinie 23132 wurde vorübergehend mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 oder CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert, für 24 Stunden inkubiert und in einer MTT-Untersuchung nach Stimulation mit 4 µg/ml gereinigtem Antikörper 103/51 nach 24 Stunden getestet. Die nicht transfizierten Zellen wurden ebenso zur Kontrolle inkubiert (Kontrolle = nichtkorrelierter humaner IgM).

d) Eine MTT-Untersuchung mit gleichen Konzentrationen (4 µg/ml) des Antikörpers 103/51 auf unterschiedlichen Epithelialtumorzelllinien zeigen eine Stimulation nur der CFR-1 positiven Zelllinien 23132 24 Stunden nach Beigabe des Antikörpers. Die CFR-1 negativen Zelllinien Colo-699 und EPLC-272H zeigen keine Stimulation durch den Antikörper 103/51.

5

Tabelle 1: Reaktionsmuster des Antikörpers 103/51 mit verschiedenen Geweben

10

Die Färbung mit Antikörpern wurde wie folgt bewertet:

15

- = kein Färben, + = mäßiges Färben, ++ = intensives Färben. HCC = Hepatozellenkarzinom (Leberzellenkrebs), ¹ Proliferationsbereich, Drüsenvertiefung, ²Glomerular, Fascicularbereich (Membranfärben), ³Sammelgefäße des retikulären Endothelgewebes.

20

Anlage A

Anlage B

Anlage S: Vergleich der Aminosäuresequenz der aus der Zelllinie

23132 gewonnenen CFR-1 mit den bereits veröffentlichten Sequenzen von CFR-1 und MG160.

25

Diese Vergleichsversuche beweisen zunächst, daß das aus der Zelllinie 23132 gewonnene CFR-1-Protein nicht identisch ist mit den vorbekannten CFR-1-Sequenzen sondern demgegenüber eine Isoform darstellt. Neben den Unterschieden gegenüber den vorbekannten und veröffentlichten CFR-1 und MG160 ist die Aminosäuresequenz einer speziellen Ausführungsform des allgemein beanspruchten Rezeptors abgesehen und von dem ersten und speziell gekennzeichneten Positionen eindeutig festgelegt.

30

RESULTATE

Reinigung und Identifizierung des Antigens 103/51

Die Western Blot Analyse wurde benutzt, um zu zeigen, daß der Antikörper 103/51 an ein etwa 130 kD Membranprotein auf einer Magenkrebszelle bindet. Die Vorreinigung dieses Proteins erfolgte durch sequenzielle Größenausschluß- und Anionenaustauschchromatographie (Fig. 1a). Das Protein wurde gewonnen aus einer Coomasie-gefärbten präparativen SDS-PAGE, ein Anteil hiervon wurde benutzt, um monoklonale Mausantikörper herzustellen (siehe unten) und der andere Teil wurde benutzt, um das Protein nach dem Verfahren, wie es Shevchenko et al. (1996 Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 93:14440:14445) beschrieben hat, zu identifizieren. Nach 3 Stunden in Geldigestieren mit Trypsin, wurden ca. 1% des insgesamt digestierten Volumens entfernt und einer hochgenauen MALDI peptid Massenspektrometrie (der Rest wurde für eine Nanoelektrosprayanalyse aufbewahrt, da eine MALDI MS nicht zu einer definierten Identifikation führte). Trotz des im Femtomolbereich liegenden Verbrauches des Proteindigestes für die MALDI-Analyse ergab die Untersuchung 35 Peptide der CFR-1 Sequenz mit einer Massengenauigkeit innerhalb von 50 ppm. Diese Peptide bilden 29% der CFR-1 Sequenz und identifizieren das Protein auf diese Weise das Protein, das ein errechnetes Molekulargewicht von etwa 134 kD hat (Burrus et al., 1992 Mol.Cell Biol. 12:5600-5609) (Fig. 1b).

25

Der Effekt der vorübergehenden Transfektion der Zelllinie 23132 mit dem CFR-Antisense-Vector auf die Färbung des Antikörpers 103/51 und Färbung von Lebendzellen

Wir untersuchten den Effekt der Antisensetransfektion der Magenkrebszelllinie 23132 unter Benutzung der Immunohistochemie und Durchflußzytometrie. Zu diesem Zweck wurde ein 897 bp PCR-

Fragment des CFR, aus dem Bereich der Basenpar 802 und 1699 entnommen, mit dem pHOOK-2-Vector im Antisensesinne im Bezug zum CMV promoter geklont. Die gewaschenen Zellen wurden in einen Zwischenschritt mit dem pHOOK-CFR Antisensevector pHOOK-lacZ und pHOOK Vektor transfiziert. Die Transfektion wurde durch eine β -Galatosidase Untersuchung (Daten nicht gezeigt) überprüft. 5 48 Stunden nach der Transfektion wurden Cytospins präpariert und mit Antikörpern 103/51 und Anti-Zytokeratin 18 zur Kontrolle gefärbt (Daten nicht gezeigt).

10

Die Immunohistochemie zeigt eine deutliche Reduzierung der Zellfärbung, die mit pHOOK-CFR Antisense Vektor transfektiert sind, im Vergleich mit Kontrollzellen (Fig. 2 a – b). Das bestätigt die Bindung 15 des Antikörpers 103/51 an CFR-1. Das leichte zytoplasmatische Färben, das in beiden Färbeprozessen zu sehen war, kann seine Ursache in nichtspezifischen Bindungen haben, wie sie oft beim Färben von menschlichen IgM Antikörpern auf azetonfixierten Zellen beobachtet wird. Die Zellexpression als auch der Einfluß der Transfektion wurden durch Durchflußzytometrie überprüft (Fig. 2 g – i). Die Daten 20 zeigen eine Reduzierung von Bindungen des Antikörpers 103/51 nach Transfektion von Zellen mit dem CFR-1 Antisense Vektor. Je- doch zeigen unbehandelte Zellen oder Zellen, die mit den Kontroll- vektor pHOOK-2 transfektiert wurden, eine deutliche Bindung zur 25 Zelllinie 23132, was die Expression von CFR-1 auf der Zellenmembran zeigt.

Um die spezifische Membranverteilung der CFR-1 Isoform zu untersuchen, färbten wir lebende Zellen der Zelllinie 23132 und einiger Nichtmagenkrebszelllinien. Auf der Zelllinie 23132 ergab sich ein 30 deutliches Färben (Fig. 2 c, d), während menschliche Lungenkarzinomzelllinien Colo-699 (Fig. 2 e, f) und EPLC-272H (Daten nicht gezeigt) eindeutig negativ waren. Diese Daten zeigen, daß die be-

schrieben CFR-1 Isoform nicht in allen Krebszelllinien vorhanden ist und ausschließlich das Einfärben der Membrane von 23132 Zellen zeigt, daß die CFR-1 Isoform eine Verteilung hat, die von der bislang für CFR-1 beschriebenen verschieden ist.

5

Glycosidaseassay

CFR-1 ist ein Sialoglycoprotein mit 5 möglichen N-Glycosylation-Armen und es wurde durch Behandlung mit Glycosidase F gezeigt, 10 daß das Molekül an diesen Stellen glycosoliert (Steegmaier et al. Nature 373:615-620, 1995). Da tumorreaktive Antikörper oft mit Carbohydrat-Gruppen reagieren, haben wir untersucht, ob dies auch für den Antikörper 103/51 der Fall ist. Cytospinpräparationen der Zelllinie 23132 wurden für 4 Stunden mit O- und N-Glycosidase inkubiert und anschließend einem immunhistochemischen Färben mit dem Antikörper 103/51 unterworfen. Die Behandlung der Zelle mit N-Glycosidase führte zu einer dramatischen Verringerung in der 103/51 Färbung (Fig. 3 b), während die Inkubierung mit Dephosphorylation Puffer (Fig. 3 a) oder die Bearbeitung mit O-Glycosidase (Daten nicht 15 gezeigt) keine Auswirkung auf die Bindung des Antikörpers 103/51 haben. Dies zeigt, daß die Bindungsspezifität des Antikörpers 103/51 in den Zuckerbestandteilen und nicht in den primären Proteinsequenzen lokalisiert sind. Zur weiteren Überprüfung dieses Effektes wurden die Membranextrakte der Zelllinie 23132 für 16 Stunden deglycosyliert und Western Blots durchgeführt und mit Antikörpern 103/51 gefärbt. Wir fanden eine Verringerung der Reaktion mit Lysaten, die mit N-Glycosidase inkubiert waren, im Vergleich zu den 20 Kontrollsaten (Fig. 3 c).

25

Herstellung muriner Antikörper und immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten des Magenkarzinoms

30

Da Antikörper gegen CFR-1 nicht käuflich erwerbbar sind, wurden Mäuse mit gereinigtem Protein, welches aus Coomassie gefärbten SDS-Gel ausgewaschen wurde, für die Produktion monoklonaler Antikörper immunisiert um die Spezifität zu bestätigen und weiterhin die CFR-1 Expression zu charakterisieren. Milzzellen wurden durch Fusion mit Heteromyelomzellen NSO konserviert. 150 Klone wurden durch immunhistochemisches Färbungen getestet. Die positiven Klone wurden erneut geklont und das Klon 58/47-49 (IgM) wurde zur weiteren Charakterisierung genutzt. Um die Bindungseigenschaften des humanen Antikörpers 103/51 und des murinen Antikörpers 58/47-69 zu untersuchen, färbten wir die Paraffinschnitte von 15 verschiedenen Magenadenokarzinom- und einem Adenozellen. Identisches Färben der Drüsenzellen der normalen Epithelialgewebe und intensives Färben der Karzinomzellen wurde erhalten (Fig. 4). Verkürzt wiedergegeben wurden die ersten Karzinomgewebe ($n = 2$) mit beiden Antikörpern gefärbt. Bei Darmkarzinomzellen haben beide Antikörper 4 von 5 Fällen angefärbt, bei diffusen Karzinomgeweben wurden alle Fälle ($n = 4$) gefärbt und bei Zwischentypen waren 50% ($n = 4$) bei beiden Antikörpern positiv. Diese Ergebnisse zeigen eine hohe Expressionsrate von CFR-1 in den meisten Fällen des Magenkarzinomgewebes. Das untersuchte Adenomagewebe zeigte ein bestimmtes Färbemuster mit positiven Zellen, nur im Übergang von den normalen zu den transformierten Zellen.

25

Immunohistochemisches Färben mit Antikörper 103/51 auf Magenschleimhaut

Um die Reaktionen des Antikörpers 103/51 auf Magenschleimhaut näher zu untersuchen, haben wir ein immunhistochemische Färbungen von Magengewebe ohne Entzündung, durch *H. pylori* bedingte chronisch aktive Gastritis, hochgradige Dysplasie und Magenadenokarzinom durchgeführt. Bei dem nichtentzündeten Magenge-

webe wurden keine Reaktionen beobachtet (Fig. 5). Jedoch fanden wir in der Magenschleimhaut eines Patienten mit H. pylori Gastritis eine Einfärbung primär im Basalbereich der Foveolarzellen. Das Färbemuster des Antikörpers 103/51 zeigt einen strengen Zusammenhang mit dem Aktivierungsmuster, wie es sich beim Ki67-Färben zeigt (Ramires et al., 1997 J. Pathol 182:62-67). Eine intensivere Färbung des Antikörpers 103/51 konnte im Proliferierungsbereich der Magendysplasi gesehen werden, das ebenso Übereinstimmung mit dem Ki67-Färbung zeigt. Die stärkste Färbung wurde in den Proliferationsbereich der Magenadenokarzinoma gefunden.

Immunohistochemisches Färben der Antikörper 103/51 und 58/47-69 auf verschiedenen Geweben

Wir untersuchten die Expression von CFR-1 in anderen kanzerogenen und normalen Geweben durch immunhistochemische Färbung auf Paraffinschnitten mit den Antikörpern 103/51 und 58/47-69. Bei 15 Krebsgeweben (verschiedener Magenkrebsarten) zeigte der Antikörper 103/51 ein Färben in 13 Fällen (Fig. 6, Tab. 1a). Ein negatives Ergebnis wurde bei den anaplastischen Zellen der Lunge beobachtet, was die Ergebnisse des immunhistochemische Färbung und der MTT-Untersuchung mit den Zelllinien Colo-699 und EPLC-272H bestätigt. Diese Daten zeigen eine starke Expression auf CFR-1 und eine Verteilung in den Zellmembranen der durch Geschwulste veränderten Zellen.

Bei den 28 untersuchten normalen Geweben wurde eine geringe Expression nur in 3 Darmproben gefunden (Tab. 1 b). Eine Färbung der Membrane wurde bei Foveoladrüsen des Magens und den glomerulären und fascicularen Bereiche der Drüsenzellen beobachtet, wohingegen ein Färben des Golgi-Apparates in den Sammelröhren der Niere gefunden wurde (Fig. 5). Dies bestätigt weiterhin die Charakte-

risierung des Antigens als CFR-1, wie es schon früher durch Burrus et al. (1992) Mol.Cell Biol. 12:5600-5609 beschrieben wurde.

5

Stimulierung mit humanen und murinen monoklonalen Antikörpern

10

Wie bereits in früheren Publikationen (Vollmers et al., 1994 Cancer 74:1525-1532; Hensel et al., 1999 Int.J.Cancer 81:229-235) erläutert, führt der Antikörper 103/51 zu einer Stimulation der Zelllinie 23132 in vitro. Wir haben diese Stimulation des Antikörpers 103/51 durch Anwendung der Mitochondrialhydroxylaseuntersuchung (MTT) gemessen, welches eine Standarduntersuchung für Proliferation darstellt (Carmichael et al., 1987 Cancer Res. 47:936-942). Um weiterhin die Stimulationseigenschaften des Antikörpers 103/51 zu untersuchen, haben wir die Zelllinie 23132 mit verschiedenen Konzentrationen gereinigter Antikörper inkubiert. Wir fanden eine konzentrationsabhängige Stimulierung mit höchster Aktivität bei 4 µg/ml (Fig. 7 a). Höhere Konzentrationen zeigten ein leichtes Abfallen in der Stimulation.

15

20

Um zu untersuchen, ob der murine Antikörper 58/47-69 den gleichen Einfluß auf das Zellwachstum hat, haben wir die MTT-Stimulationsuntersuchung mit gereinigten Antikörpern in vergleichbarer Menge durchgeführt. Wie aus Fig. 7 b entnommen werden kann, führten beide Antikörper zu einer Stimulation der Zelllinie 23132 in vitro. Dies bestätigt weiterhin die identische Spezifität beider Antikörper.

25

30

Um zu bestätigen, daß die Stimulation des Antikörpers 103/51 und des murinen Antikörpers 58/47-69 durch die Bindung an CFR-1 vermittelt wird, haben wir die Zellen mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 und dem CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert und die Zellen durch eine MTT-Untersuchung getestet. Als positive Kontrolle für die

5

Transfektion wurden die Zellen ebenso mit den pHOOK-2-lacZ Vektor transfiziert und danach mit β -Galactosidose eingefärbt (Daten nicht gezeigt). Da vergleichbare Stimulationen in den nichttransfektierten Fällen und den Zellen, die mit dem Kontrollvektor pHOOK-2 transfektiert wurden, beobachtet werden konnte, kann eine Reduzierung des Stimulationseffektes durch den Transfektionsprozeß ausgeschlossen werden. Im Gegensatz hierzu zeigten die Zellen, die mit dem CFR-1 Antisense-Vektor transfiziert wurden, eine verringerte Stimulation (Fig. 7 c).

10

15

Schließlich wurde, um zu zeigen, daß die Stimulation durch den Antikörper 103/51 nicht durch andere Rezeptoren als den CFR-1 vermittelt wurde, eine MTT-Stimulationsuntersuchung mit der Zelllinie 23132 vorgenommen und mit der CFR-1 negativen Lungenkarzinomzelllinien Colo-699 und EPLC-272H verglichen. Während die Zelllinie 23132, wie oben beschrieben, stimuliert wird, zeigten die beiden Lungenkarzinomzelllinien keine Stimulation durch den Antikörper 103/51 (Fig. 7 d), was die Resultate der Immunhistochemie bestätigt.

Patentansprüche

1. Rezeptor auf der Oberflächenmembran von stark proliferierenden
5 Zellen insbesondere des Magenkarzinoms, der aus Glykoproteinen
aufgebaut ist,
dadurch gekennzeichnet,
dass wenigstens eine Determinante des Glykoproteins mit einer des
CFR-1 Proteins übereinstimmt und
10 der humane Antikörper 103/51 und/oder der murine Antikörper
58/47-69 (IgM) am Glykoprotein spezifisch bindet.

2. Rezeptor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die
15 spezifische Bindungsstelle am Glykoprotein ein Carbohydrat-Rest (=
Zucker-Rest) ist.

3. Rezeptor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die
20 primäre Aminosäuresequenz des Glykoproteins zu mindestens 80 %
mit der des CFR-1 übereinstimmt (homolog ist).

4. Rezeptor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die
25 Determinante des Glykoproteins die in Anlage S Zelllinie 23132 wie-
dergegebene Aminosäuresequenz auweist.

5. Rezeptor nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **gekennzeichnet**
30 **durch** ein Molekulargewicht von etwa 130 kD.

6. Verwendung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüchen, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Rezeptor zur Ausbildung von Antikörpern *in vivo* verabreicht wird.

5

7. Verwendung des Rezeptors zur Bekämpfung von Tumoren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Rezeptor vor (zur Prophylaxe) oder mit dem Ausbruch der Krankheit (zur Therapie) verabreicht wird.

10

15

8. Verwendung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Bekämpfung folgender Tumore: Speiseröhre, Magen, Darm, Rektum, Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse, Lunge, Bronchien, Brust, Cervix, Prostata, Cardia, Barrett, Eierstock und/oder Uterus.

20

9. Verwendung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Bekämpfung folgender Tumorvorstufen:

25

des Magens:

- Dysplasie der Magenschleimhaut
- Intestinale Metaplasie des Magens
- *Helicobacter pylori* assoziierte Gastritis
- Tubuläre und tubulovillöse Adenome des Magens

30

des Dickdarmes:

- Tubuläre Adenome des Colons
- Villöse Adenome des Colons
- Dysplasie bei Collitis ulcerosa

in der Speiseröhre

- Barrett-Dysplasie des Ösophagus
- Barrett-Metaplasie des Ösophagus

5 des Gebärmutterhalses

- Cervicale intraepitheliale Neoplasie I
- Cervicale intraepitheliale Neoplasie II
- Cervicale intraepitheliale Neoplasie III

10 der Lunge:

- Plattenepithel Metaplasie des Bronchus
- Plattenepithel Dysplasie des Bronchus

15 10. Verwendung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche zu Diagnosezwecken, **dadurch gekennzeichnet**, dass über die Bindefähigkeit von Antikörpern an den Rezeptor ein Nachweis für die Existenz, die Lokalisierung und/oder die Menge der entsprechenden Antikörper bzw. Rezeptoren geführt wird.

20

11. Verwendung nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Antikörper Tumorantikörper sind.

25

12. Verwendung nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Rezeptor ein Tumormarker ist.

30 13. Verfahren zur Gewinnung des Rezeptors nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** folgende Schritte:

5 a) Präparieren von Membranproteinen von Zellen der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132
 b) Durchführen einer Größenausschlußchromatographie sowie
 c) einer Anionenaustauschchromatographie und
 d) schließlich Gewinnung durch eine préparative SDS-PAGE.

10 14. Muriner Mausantikörper 58/47-69 zur Verwendung in einem der vorhergehenden Ansprüche und einer Struktur, die durch folgende Merkmale gekennzeichnet ist:

15 Die variable Region der schweren Kette ist homolog zur IGHV 1S 125* 01 gemäß Anlage A, wobei das D-Segment homolog zu IGHD-ST 4*01 und das J-Segment homolog zur IGHJ4*01 ist, und die variable Region der leichten Kette eine Struktur gemäß Anlage B aufweist, die homolog zu IGKV- 17* 01 ist, wobei das J-Segment homolog ist zu IGKJ2*01.

20 15. Verfahren zur Herstellung eines Antitumormittels unter Verwendung von Rezeptoren nach einem der vorhergehenden Ansprüchen, **dadurch gekennzeichnet**,

25 dass eine potentiell antitumorwirksame Substanz auf ihre spezifische Bindefähigkeit an Rezeptoren nach einem der vorhergehenden Ansprüchen überprüft und bei positiven Ergebnis diese Substanz für die pharmazeutische Anwendung konfektioniert und hierbei mit üblichen Zusatzstoffen versehen wird.

30 16. Verfahren zur Herstellung eines Antitumormittels unter Verwendung von Rezeptoren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei den Substanzen um humane Antikörper und/oder Mausantikörper und/oder humanisierte Mausantikörper und/oder Fab

und F(ab)₂- und Fab'-Fragmente und/oder Einzelstrangantikörper und/oder tetramere und/oder dimere Antikörperperformen und/oder bispezifische Antikörper handelt.

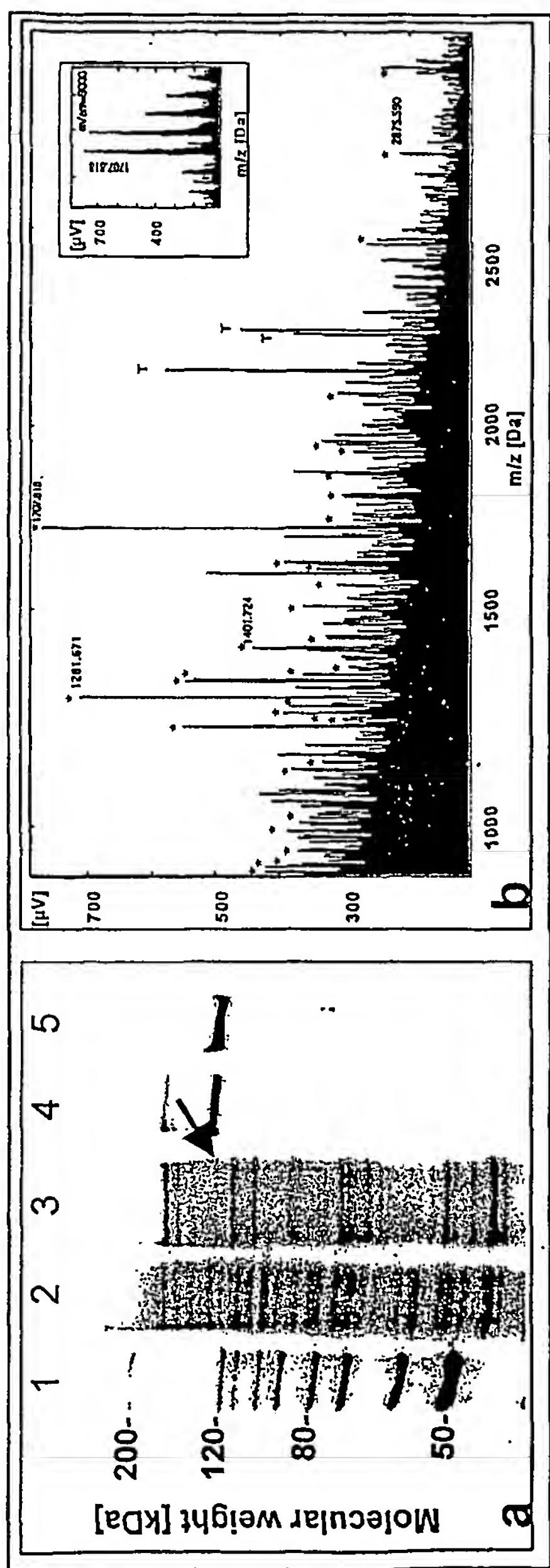
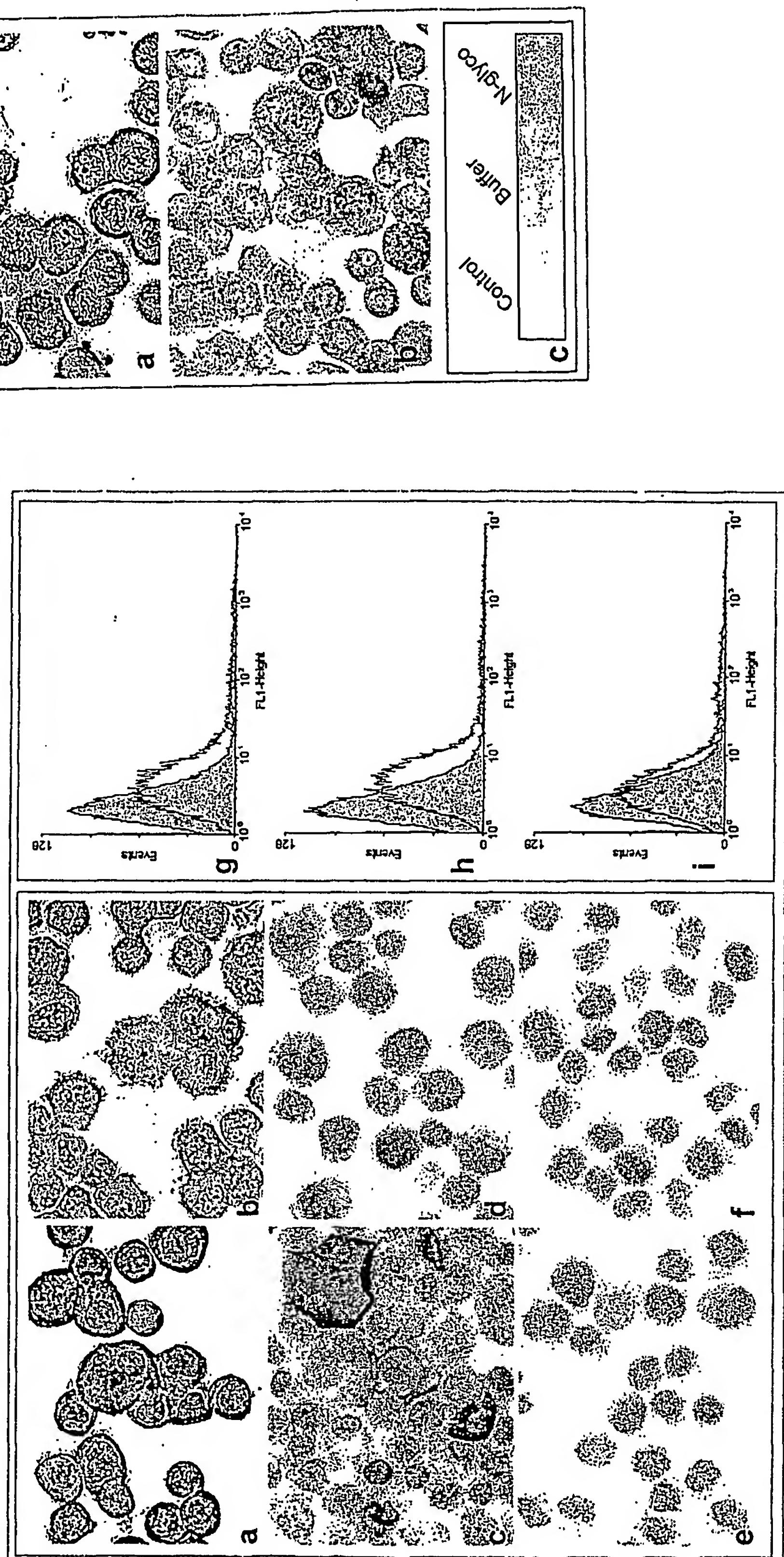
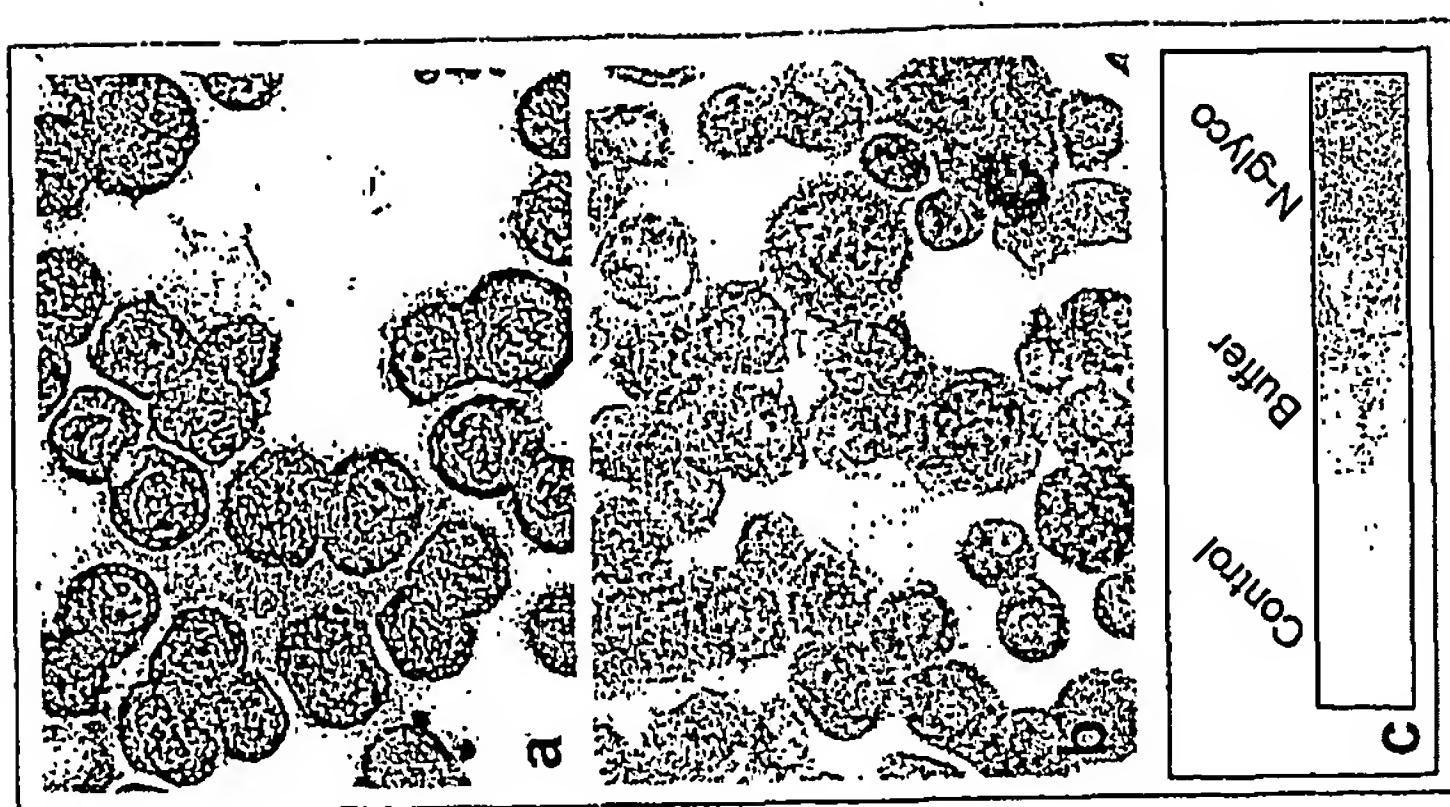
**Fig. 2****Fig. 3**

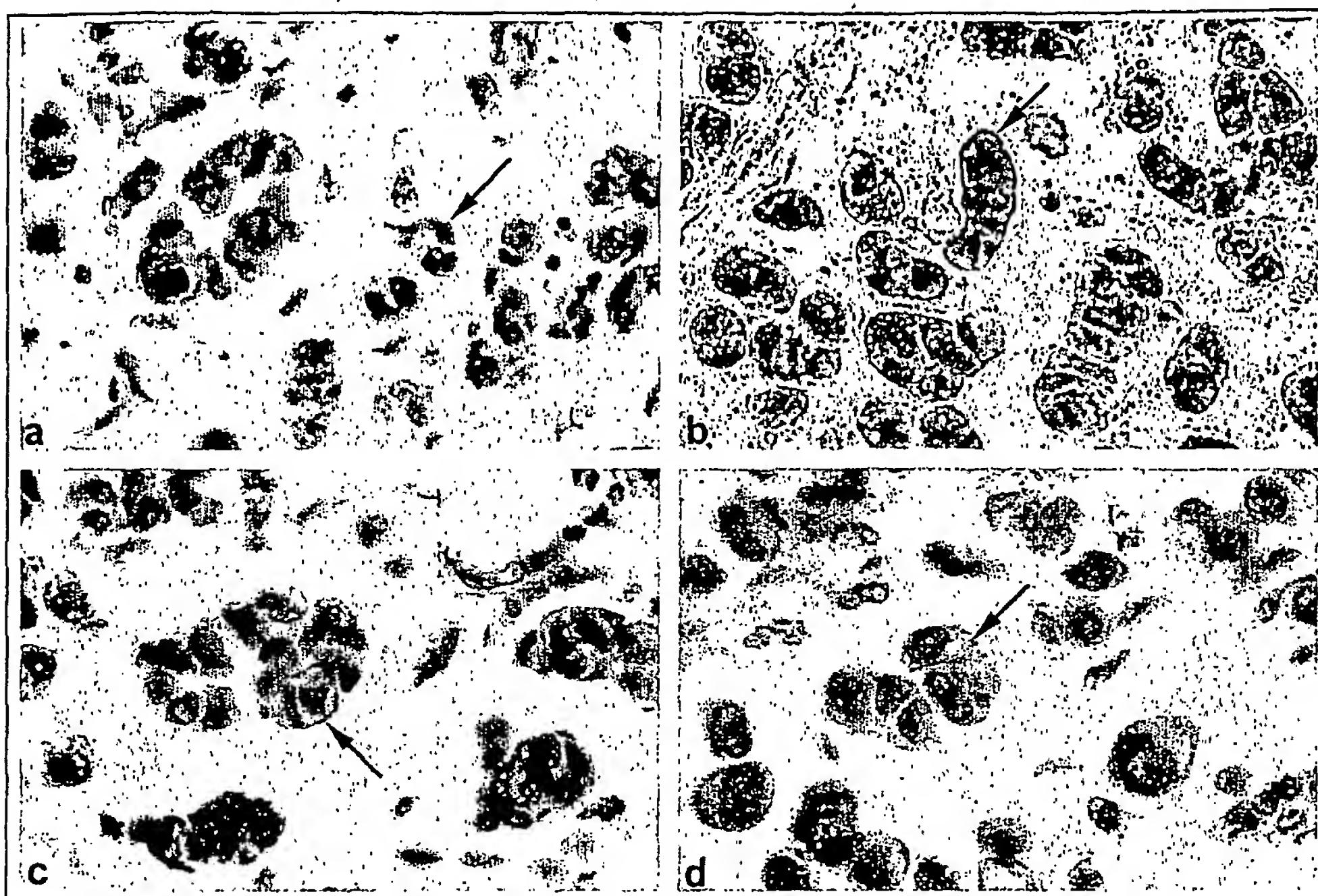
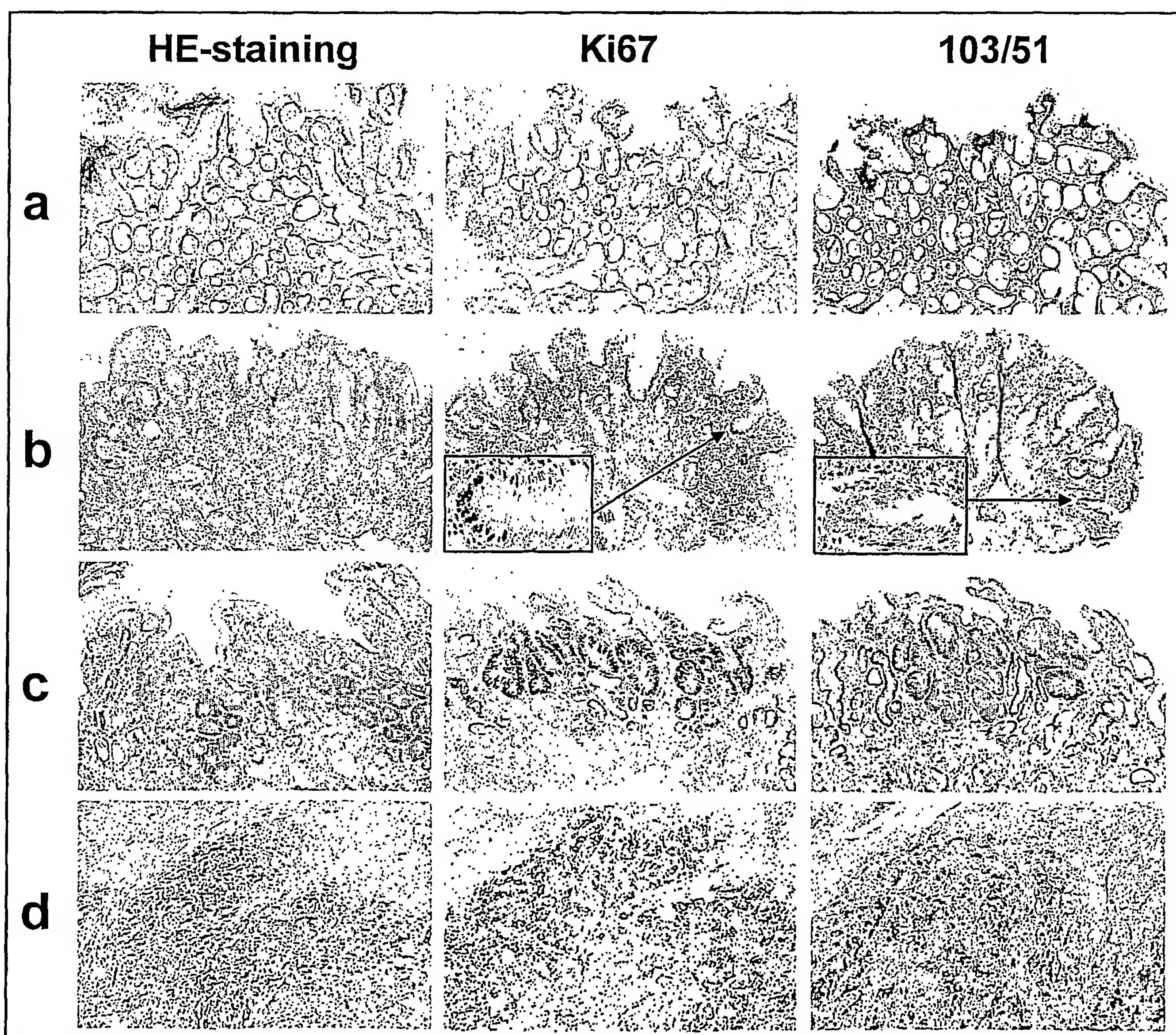
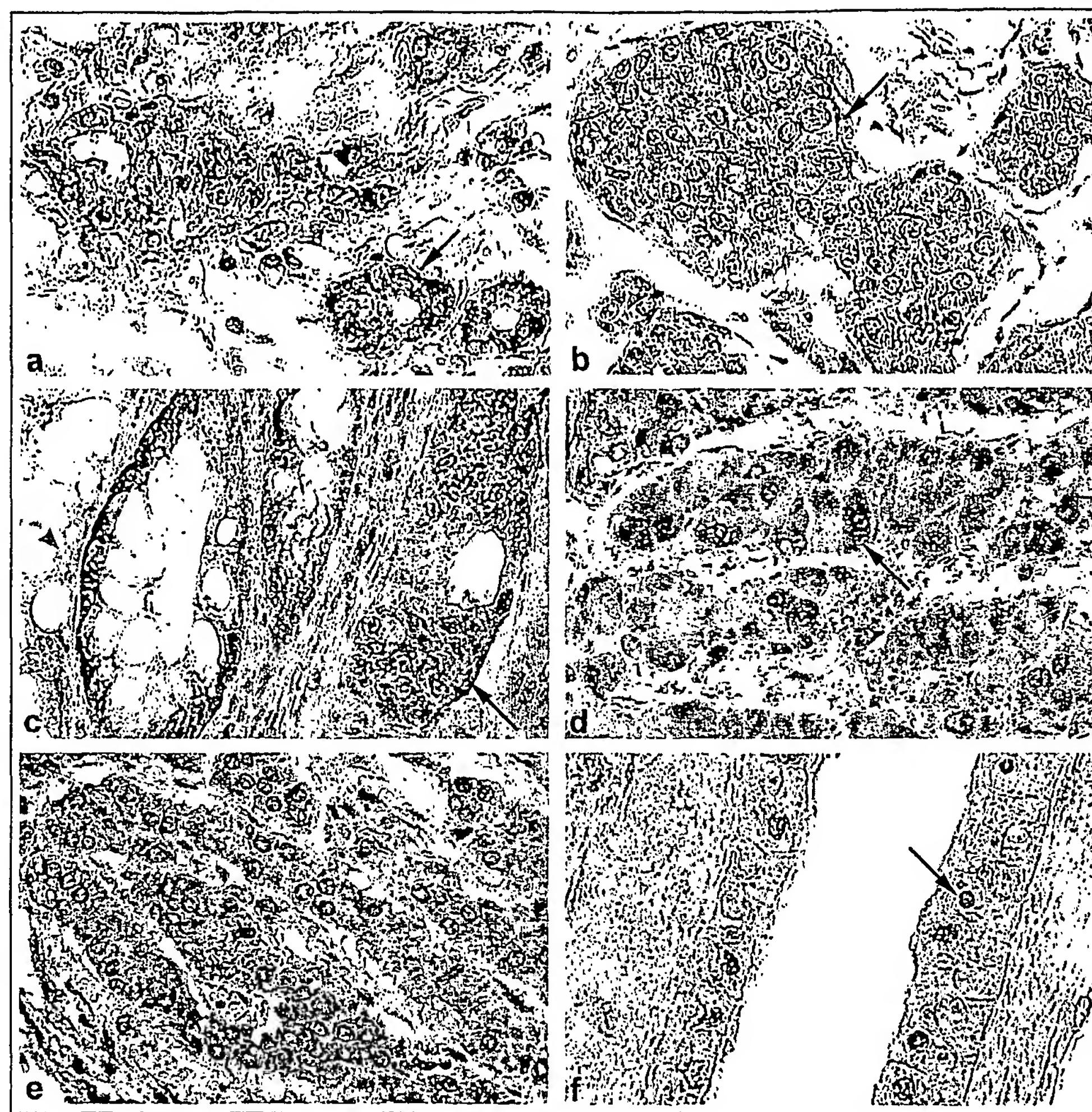
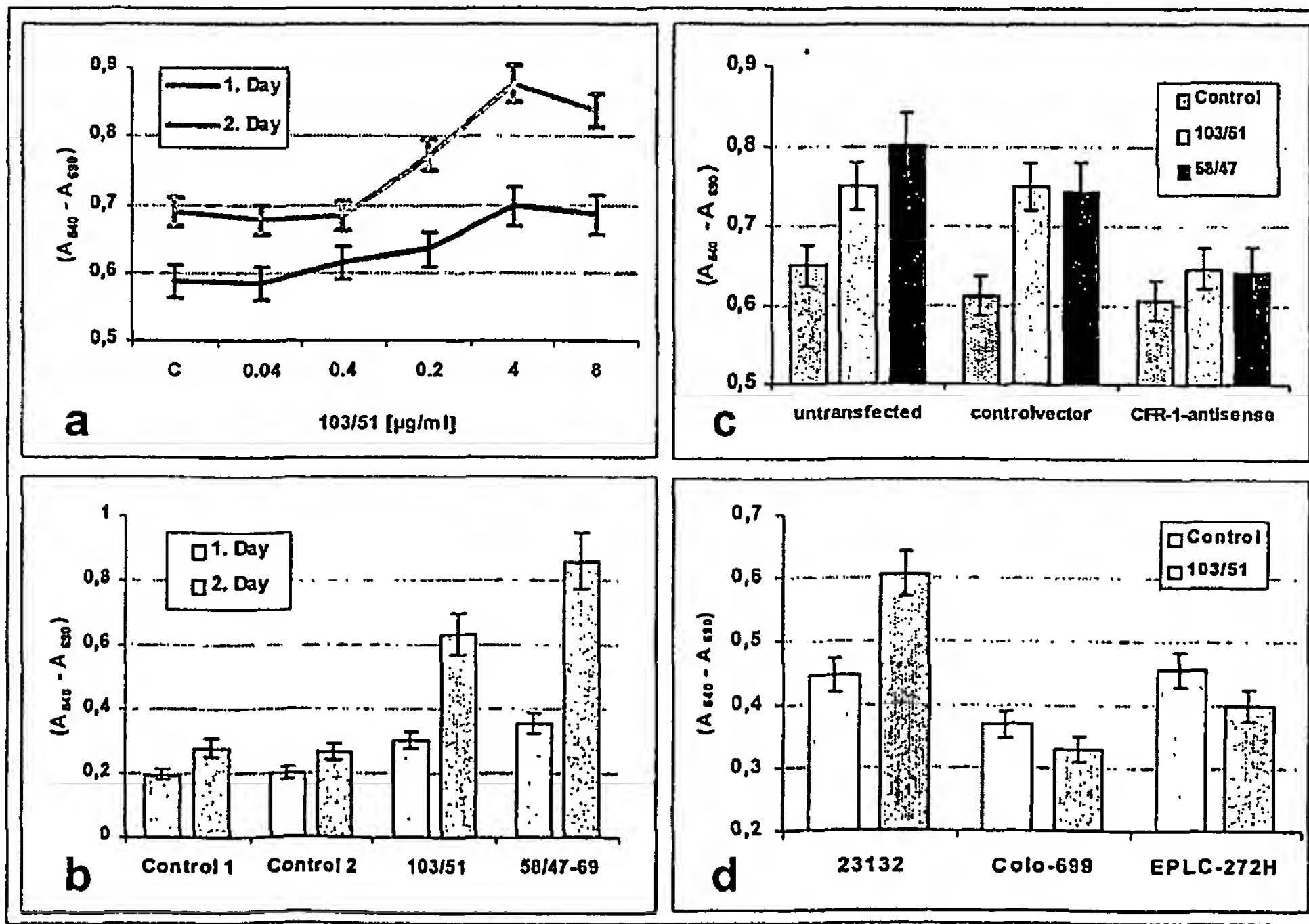
Fig. 4**Fig. 5**

Fig. 6**Fig. 7**

Tab. 1**a) Tumor tissues**

Tissue	Carcinoma-type	Antibody-Staining
Esophagus	Squamous	+
Stomach	Adeno (diffuse)	++
Stomach	Adeno (intestinal)	+
Colon	Adeno	+
Rectum	Adeno	+
Liver	Adeno (HCC)	++
Gallbladder	Adeno	+
Pancreas	Adeno (ductal)	+
Papilla of Vater	Adeno	+
Lung	Large cell anaplastic	-
Lung	Small cell	-
Lung	Adeno	++
Bronchus	Squamous epithelium	+
Mamma	Invasive (ductal)	+
Mamma	Invasive (lobular)	+

b) Normal tissues

Tissue	Cell type	Antibody-Staining
Salivary gland	Glandular	-
Stomach (non inflamed)	Glandular	-
Stomach (<i>H. pylori</i> infected)	Glandular	+ ¹
Stomach (high grade dysplasia)	Glandular	++ ¹
Duodenum	Glandular	-
Colon	Epithelial	-
Rectum	Glandular	-
Pancreas	Glandular	-
Liver	Glandular	-
Gallbladder	Glandular	-
Oral mucosa	Squamous epithelium	-
Anal mucosa	Squamous epithelium	-
Skin	Keratinocyte, glandular	-
Mamma	Glandular	-
Larynx	Epithelial	-
Bronchus	Epithelial	-
Lung	Glandular, alveolar	-
Thyroid gland	Glandular	-
Adenohypophysis	Glandular	-
Adrenal gland	Glandular	++ ²
Testis	Glandular	-
Ovar	Glandular	-
Prostate	Glandular	-
Urothelium	Epithelial	-
Kidney	Epithelial	++ ³
Thymus	Lymphatic	-
Spleen	Lymphatic	-
Lymph node	Lymphatic	-
Cerebral cortex	Neural	-
Peripheric neural ganglia	Neural	-

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad
Prof. Dr. Vollmers, Heinz
Dr. Hensel, Frank

<120> Rezeptor, dessen Verwendung und Mausantikörper

<141> 2002-03-09

<211> 288 bp

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<220> Sequenz der variablen Region der schweren Kette (V_H) des Antikörpers NM58-49/69

<221> V-Region

<222> (1).....(288)

<400>

tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc act gac tac tat ata aac tgg gtg aag cag agg 60
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg
1 5 10 15 20

act gga cag ggc ctt gag tgg att gga gag att tat cct gga agt ggt aat act tac tac 120
Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr
25 30 35 40

aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac 180
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
45 50 55 60

atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat ttc tgt gca aga tcg gga 240
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly
50 55 60 65

tta cga ccc tat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc 288
Leu Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
70 75 80

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad
Prof. Dr. Vollmers, Heinz
Dr. Hensel, Frank

<120> Rezeptor, dessen Verwendung und Mausantikörper

<141> 2002-03-09

<211> 315 bp

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<220> Sequenz der variablen Region der leichten Kette (V_L) des Antikörpers NM58-49/69

<221> V-Region

<222> (1).....(315)

<400>

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad
 Prof. Dr. Vollmers, Heinz
 Dr. Hensel, Frank

<120> Rezeptor, dessen Verwendung und Mausantikörper

<141> 2002-03-09

<211> 3114

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> Cysteine-rich FGF Rezeptor der Magenkarzinomzelllinie 23132

<221> CDS

<222> (450).....(3563)

<400>

450	GAT GTG AGG GAG CCT GAA AAT GAA ATT TCT TCA GAC TGC AAT CAT TTG TTG TGG AAT TAT	509			
	Asp Val Arg Glu Pro Glu Asn Glu Ile Ser Ser Asp Cys Asn His Leu Leu Trp Asn Tyr				
143	145	150	155	160	

AAG CTG AAC CTA ACT ACA GAT CCC AAA TTT GAA TCT GTG GCC AGA GAG GTT TGC AAA TCT	569			
Lys Leu Asn Leu Thr Thr Asp Pro Lys Phe Glu Ser Val Ala Arg Glu Val Cys Lys Ser				
165	170	175	180	

ACT ATA ACA GAG ATT GAA GAA TGT GCT GAT GAA CCG GTT GGA AAA GGT TAC ATG GTT TCC	629			
Thr Ile Thr Glu Ile Glu Glu Cys Ala Asp Glu Pro Val Gly Lys Gly Tyr Met Val Ser				
185	190	195	200	

TGC TTG GTG GAT CAC CGA GGC AAC ATC ACT GAG TAT CAG TGT CAC CAG TAC ATT ACC AAG	689			
Cys Leu Val Asp His Arg Gly Asn Ile Thr Glu Tyr Gln Cys His Gln Tyr Ile Thr Lys				
205	210	215	220	

ATG ACG GCC ATC ATT TTT AGT GAT TAC CGT TTA ATC TGT GGC TTC ATG GAT GAC TGC AAA	749			
Met Thr Ala Ile Ile Phe Ser Asp Tyr Arg Leu Ile Cys Gly Phe Met Asp Asp Cys Lys				
225	230	235	240	

AAT GAC ATC AAC ATT CTG AAA TGT GGC AGT ATT CGG CTT GGA GAA AAG GAT GCA CAT TCA	809			
Asn Asp Ile Asn Ile Leu Lys Cys Gly Ser Ile Arg Leu Gly Glu Lys Asp Ala His Ser				
245	250	255	260	

CAA GGT GAG GTG GTA TCA TGC TTG GAG AAA GGC CTG GTG AAA GAA GCA GAA GAA AGA GAA	869			
Gln Gly Glu Val Val Ser Cys Leu Glu Lys Gly Leu Val Lys Glu Ala Glu Glu Arg Glu				
265	270	275	280	

CCC AAG ATT CAA GTT TCT GAA CTC TGC AAG AAA GCC ATT CTC CGG GTG GCT GAG CTG TCA	929			
Pro Lys Ile Gln Val Ser Glu Leu Cys Lys Ala Ile Leu Arg Val Ala Glu Leu Ser				
285	290	295	300	

TCG GAT GAC TTT CAC TTA GAC CGG CAT TTA TAT TTT GCT TGC CGA GAT GAT CGG GAG CGT	989			
Ser Asp Asp Phe His Leu Asp Arg His Leu Tyr Phe Ala Cys Arg Asp Asp Arg Glu Arg				
305	310	315	320	

TTT TGT GAA AAT ACA CAA GCT GGT GAG GGC AGA GTG TAT AAG TGC CTC TTT AAC CAT AAA	1049			
Phe Cys Glu Asn Thr Gln Ala Gly Glu Gly Arg Val Tyr Lys Cys Leu Phe Asn His Lys				
325	330	335	340	

TTT GAA GAA TCC ATG AGT GAA AAG TGT CGA GAA GCA CTT ACA ACC CGC CAA AAG CTG ATT Phe Glu Glu Ser Met Ser Glu Lys Cys Arg Glu Ala Leu Thr Thr Arg Gln Lys Leu Ile 345 350 355 360	1109
GCC CAG GAT TAT AAA GTC AGT TAT TCA TTG GCC AAA TCC TGT AAA AGT GAC TTG AAG AAA Ala Gln Asp Tyr Lys Val Ser Tyr Ser Leu Ala Lys Ser Cys Lys Ser Asp Leu Lys Lys 365 370 375 380	1169
TAC CGG TGC AAT GTG GAA AAC CTT CCG CGA TCG CGT GAA GCC AGG CTC TCC TAC TTG TTA Tyr Arg Cys Asn Val Glu Asn Leu Pro Arg Ser Arg Glu Ala Arg Leu Ser Tyr Leu Leu 385 390 395 400	1229
ATG TGC CTG GAG TCA GCT GTA CAC AGA GGG CGA CAA GTC AGC AGT GAG TGC CAG GGG GAG Met Cys Leu Glu Ser Ala Val His Arg Gly Arg Gln Val Ser Ser Glu Cys Gln Gly Glu 405 410 415 420	1289
ATG CTG GAT TAC CGA CGC ATG TTG ATG GAA GAC TTT TCT CTG AGC CCT GAG ATC ATC CTA Met Leu Asp Tyr Arg Arg Met Leu Met Glu Asp Phe Ser Leu Ser Pro Glu Ile Ile Leu 425 430 435 440	1349
AGC TGT CGG GGG GAG ATT GAA CAC CAT TGT TCC GGA TTA CAT CGA AAA GGG CGG ACC CTA Ser Cys Arg Gly Glu Ile Glu His His Cys Ser Gly Leu His Arg Lys Gly Arg Thr Leu 445 450 455 460	1409
CAC TGT CTG ATG AAA GTA GTT CGA GGG GAG AAG GGG AAC CTT GGA ATG AAC TGC CAG CAG His Cys Leu Met Lys Val Val Arg Gly Glu Lys Gly Asn Leu Gly Met Asn Cys Gln Gln 465 470 475 480	1469
GCG CTT CAA ACA CTG ATT CAG GAG ACT GAC CCT GGT GCA GAT TAC CGC ATT GAT CGA GCT Ala Leu Gln Thr Leu Ile Gln Glu Thr Asp Pro Gly Ala Asp Tyr Arg Ile Asp Arg Ala 485 490 495 500	1529
TTG AAT GAA GCT TGT GAA TCT GTA ATC CAG ACA GGC TGC AAA CAT ATA AGA TCT GGA GAC Leu Asn Glu Ala Cys Glu Ser Val Ile Gln Thr Ala Cys Lys His Ile Arg Ser Gly Asp 505 510 515 520	1589
CCA ATG ATC TTG TCG CTG ATG GAA CAT TTA TAC ACA GAG AAG ATG GTA GAA GAC TGT Pro Met Ile Leu Ser Cys Leu Met Glu His Leu Tyr Thr Glu Lys Met Val Glu Asp Cys 525 530 535 540	1649
GAA CAC CGT CTC TTA GAG CTG CAG TAT TTC ATC TCC CGG GAT TGG AAG CTG GAC CCT GTC Glu His Arg Leu Leu Glu Leu Gln Tyr Phe Ile Ser Arg Asp Trp Lys Leu Asp Pro Val 545 550 555 560	1709
CTG TAC CGC AAG TGC CAG GGA GAC GCT TCT CGT CTT TGC CAC ACC CAC GGT TGG AAT GAG Leu Tyr Arg Lys Cys Gln Gly Asp Ala Ser Arg Leu Cys His Thr His Gly Trp Asn Glu 565 570 575 580	1769
ACC AGC GAA TTT ATG CCT CAG GGA GCT GTG TTC TCT TGT TTA TAC AGA CAC GCC TAC CGC Thr Ser Glu Phe Met Pro Gln Gly Ala Val Phe Ser Cys Leu Tyr Arg His Ala Tyr Arg 585 590 595 600	1829
ACT GAG GAA CAG GGA AGG AGG CTC TCA CGG GAG TGC CGA GCT GAA GTC CAA AGG ATC CTA Thr Glu Glu Gln Gly Arg Arg Leu Ser Arg Glu Cys Arg Ala Glu Val Gln Arg Ile Leu 605 610 615 620	1889

TGG TTG AAG CAA AAT AAA AAC AGT GAA TTG ATG GAT CCC AAA TGC AAA CAG ATG ATA Acc	2789
Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu Met Asp Pro Lys Cys Lys Gln Met Ile Thr	
905 910 915 920	
AAG CGC CAG ATC ACC CAG AAC ACA GAT TAC CGC TTA AAC CCC ATG TTA AGA AAA GCC TGT	2849
Lys Arg Gln Ile Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Arg Leu Asn Pro Met Leu Arg Lys Ala Cys	
925 930 935 940	
AAA GCT GAC ATT CCT AAA TTC TGT CAC GGT ATC CTG ACT AAG GCC AAG GAT GAT TCA GAA	2909
Lys Ala Asp Ile Pro Lys Phe Cys His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp Ser Glu	
945 950 955 960	
TTA GAA GGA CAA GTC ATC TCT TGC CTG AAG CTG AGA TAT GCT GAC CAG CGC CTG TCT TCA	2969
Leu Glu Gly Gln Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala Asp Gln Arg Leu Ser Ser	
965 970 975 980	
GAC TGT GAA GAC CAG ATC CGA ATC ATT ATC CAG GAG TCC GCC CTG GAC TAC CGC CTG GAT	3029
Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Gln Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Arg Leu Asp	
985 990 995 1000	
CCT CAG CTC CAG CTG CAC TGC TCA GAC GAG ATC TCC AGT CTA TGT GCT GAA GAA GCA GCA	3089
Pro Gln Leu Gln Leu His Cys Ser Asp Glu Ile Ser Ser Leu Cys Ala Glu Ala Ala	
1005 1010 1015 1020	
GCC CAA GAG CAG ACA GGT CAG GTG GAG GAG TGC CTC AAG GTC AAC CTG CTC AAG ATC AAA	3149
Ala Gln Glu Gln Thr Gly Gln Val Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys Ile Lys	
1025 1030 1035 1040	
ACA GAA TTG TGT AAA AAG GAA GTG CTA AAC ATG CTG AAG GAA AGC AAA GCA GAC ATC TTT	3209
Thr Glu Leu Cys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu Ser Lys Ala Asp Ile Phe	
1045 1050 1055 1060	
GTT GAC CCG GTA CTT CAT ACT GCT TGT GCC CTG GAC ATT AAA CAC CAC TGC GCA GCC ATC	3269
Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala Leu Asp Ile Lys His His Cys Ala Ala Ile	
1065 1070 1075 1080	
ACC CCT GGC CGC GGG CGT CAA ATG TCC TGT CTC ATG GAA GCA CTG GAG GAT AAG CGG GTG	3329
Thr Pro Gly Arg Gly Arg Gln Met Ser Cys Leu Met Glu Ala Leu Glu Asp Lys Arg Val	
1085 1090 1095 1100	
AGG TTA CAG CCC GAG TGC AAA AAG CGC CTC AAT GAC CGG ATT GAG ATG TGG AGT TAC GCA	3389
Arg Leu Gln Pro Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser Tyr Ala	
1105 1110 1115 1120	
GCA AAG GTG GCC CCA GCA GAT GGC TTC TCT GAT CTT GCC ATG CAA GTA ATG ACG TCT CCA	3449
Ala Lys Val Ala Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met Gln Val Met Thr Ser Pro	
1125 1130 1135 1140	
TCT AAG AAC TAC ATT CTC TCT GTG ATC AGT GGG AGC ATC TGT ATA TTG TTC CTG ATT GGC	3509
Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly Ser Ile Cys Ile Leu Phe Leu Ile Gly	
1145 1150 1155 1160	
CTG ATG TGT GGA CGG ATC ACC AAG CGA GTG ACA CGA GAG CTC AAG GAC AGG TAG	3563
Leu Met Cys Gly Arg Ile Thr Lys Arg Val Thr Arg Glu Leu Lys A Asp Arg ***	
1165 1170 1175 1179	

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Februar 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/011907 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/705,
A61K 38/16, C07K 16/28

(74) Anwalt: PÖHNER, Wilfried; Röntgenring 4, Postfach 63
23, 97070 Würzburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE02/02699

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, CN, IL, JP, RU,
US.

(22) Internationales Anmeldedatum:

23. Juli 2002 (23.07.2002)

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

101 36 009.6

24. Juli 2001 (24.07.2001) DE

102 10 425.5

9. März 2002 (09.03.2002) DE

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 16. Oktober 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: MÜLLER-HERMELINK, Hans, Konrad [DE/DE]; Heinrich-Zeuner-Strasse 72, 97082 Würzburg (DE). VOLLMERS, Heinz [DE/DE]; Budapeststrasse 23, 97084 Würzburg (DE). HENSEL, Frank [DE/DE]; Am Exerzierplatz 1, 97070 Würzburg (DE).



A3

(54) Title: RECEPTOR, THE USE THEREOF, AND MOUSE ANTIBODIES

(54) Bezeichnung: REZEPTOR, DESSEN VERWENDUNG SOWIE MAUSANTIKÖRPER

(57) Abstract: The invention relates to a receptor located on the surface membrane of highly proliferative cells, particularly of the gastric carcinoma, which is composed of glycoproteins. At least one determinant of the glycoprotein corresponds with one of the CFR-1 protein, and the human antibody 103/51 and/or the murine antibody 58/47-69 (IgM) specifically binds to the glycoprotein.

(57) Zusammenfassung: Rezeptor auf der Oberflächenmembran von stark proliferierenden Zellen insbesondere des Magenkarzinoms, der aus Glykoproteinen aufgebaut ist, wobei wenigstens eine Determinante des Glykoproteins mit einer des CFR-1 Proteins übereinstimmt und der humane Antikörper 103/51 und/oder der murine Antikörper 58/47-69 (IgM) am Glykoprotein spezifisch bindet.

WO 03/011907 A3

BOX I. I.

Although Claims 6-12 relate to a method for treatment of the human or animal body or to a diagnostic method practiced on the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

BOX I.2

Claim No: 16

Claim 16 lacks the requisite clarity (PCT Article 6) to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search (PCT Article 17(1)(a)(ii)). Claim 16 relates to "receptors according to Claim 15". Claim 15, however, is a method claim.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte. nationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/02699

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C07K14/705 A61K38/16 C07K16/28

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

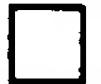
SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, SCISEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HENSEL FRANK ET AL: "A new variant of cystein-rich FGF receptor (CFR-1) specifically expressed on tumor cells." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, Bd. 41, März 2000 (2000-03), Seite 698 XP001154022 91st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research.; San Francisco, California, USA; April 01-05, 2000, March, 2000 ISSN: 0197-016X das ganze Dokument ---- -/-	1-15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelddatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelddatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelddatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

6. August 2003

22/08/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrmann, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/02699

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MOURELATOS ZISSIMOS ET AL: "Cloning and sequence analysis of the human MG160, a fibroblast growth factor and E-selectin binding membrane sialoglycoprotein of the Golgi apparatus." DNA AND CELL BIOLOGY, Bd. 15, Nr. 12, 1996, Seiten 1121-1128, XP001154021 ISSN: 1044-5498 99,7% identisch mit SEQ ID NO:6 in einem Überlappungsbereich von 1037 Aminosäuren das ganze Dokument ---	1-3,5-15
X	HENSEL FRANK ET AL: "Mitogenic autoantibodies in Helicobacter pylori-associated stomach cancerogenesis." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, Bd. 81, Nr. 2, 12. April 1999 (1999-04-12), Seiten 229-235, XP002250371 ISSN: 0020-7136 in der Anmeldung erwähnt Seite 233, linke Spalte, Zeile UNTEN; Abbildung 2 ---	1-15
A	VOLLMERS H PETER ET AL: "Human monoclonal antibodies from stomach carcinoma patients react with Helicobacter pylori and stimulate stomach cancer cells in vitro." CANCER (PHILADELPHIA), Bd. 74, Nr. 5, 1994, Seiten 1525-1532, XP009015348 ISSN: 0008-543X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-15
A	VOLLMERS H PETER ET AL: "Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: First clinical and histopathological results." ONCOLOGY REPORTS, Bd. 5, Nr. 3, Mai 1998 (1998-05), Seiten 549-552, XP009015315 ISSN: 1021-335X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-15
	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/02699

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	HENSEL FRANK ET AL: "A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody." LABORATORY INVESTIGATION, Bd. 81, Nr. 8, August 2001 (2001-08), Seiten 1097-1108, XP002250372 ISSN: 0023-6837 das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 02/02699

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. 16
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. Ansprüche Nr. 16
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 6-12 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers oder ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 16

Anspruch 16 entspricht den vorgeschriebenen Anforderungen bezüglich Klarheit (Art. 6 PCT) so wenig, daß eine sinnvolle Recherche nicht durchgeführt werden kann (Art. 17(2)(a)(ii) PCT). Anspruch 16 bezieht sich auf "Rezeptoren nach Anspruch 15". Anspruch 15 ist jedoch ein Verfahrensanspruch.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

Translation of WO 2003/011907

Receptor, its use, and mouse antibody

The present invention relates to a receptor found on the surface of rapidly proliferating cells, particularly gastric carcinoma cells, its use, and the structure of a 5 mouse antibody which binds specifically thereto.

Using monoclonal antibodies generated from hybridomas for clinical and scientific assays is widely known. The administration of human monoclonal antibodies produced from B-cell hybridomas is promising for the treatment of tumors, viral and 10 microbial infections, B-cell immunodeficiencies with reduced antibody production, and other impairments of the immune system.

Gastric carcinoma is one of the most frequently occurring types of cancer worldwide. According to Lauren, "The two histological main types of gastric carcinoma," Acta 15 Path. Microbiol. Scand. 64:331-49, it is histologically divided into diffuse adenocarcinoma and intestinal adenocarcinoma. Intestinal gastric carcinomas are often accompanied by chronic type B gastritis and particularly by intestinal metaplasias, which are considered to be precursors of dysplastic changes and of gastric carcinomas. Differences between these two types are also shown in that 20 patients having carcinomas of the diffuse type often belong to blood group A, from which the influence of genetic factors on the cancer risk may be concluded, while environmental factors, e.g., a *Helicobacter pylori* infection, is possibly significant for the occurrence of carcinomas of the intestinal type. A reduced frequency of gastric adenocarcinoma has been established in the West, but it is now increasingly occurring 25 in the East.

The development of stomach cancer is a multi-step and multi-factor process (Correa, 1992, Cancer Res. 52:6735-6740). Although little is known about molecular mechanisms, factors such as high salt intake, alcohol, nitrosamines, and infection with 30 the bacterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) are clearly proven to be involved in the initiation of stomach carcinogenesis. Due to a strong correlation between *H. pylori* infection and the occurrence of gastritis, dysplasia, and development of gastric cancer, the bacterium has been classified as a class I carcinogen by the WHO. *H. pylori*

directly induces serious precancerous cellular changes in the mucosal environment and is also responsible for the increase of autoantibodies, which are frequently observed in gastritis and stomach cancer patients (Negrini *et al.*, 1996, Gastroenterol. 111:655-665). These antibodies are able to induce gastric lesions and apoptosis in the 5 gastric epithelium (Steiniger *et al.*, 1998, Virchows Arch. 433:13-18). The nature of the antigens still is partially unknown. Antibodies against the gastric H⁺/K⁽⁺⁾-ATPase (Claeys *et al.*, 1998, Gastroenterology 115:340-347), Interleukin-8 (Crabtree *et al.*, 1993, Scand. J. Immunol. 37:65-70; Ma *et al.*, 1994, Scand. J. Gastroenterol. 29:961-965) and Lewis blood group antigens (Appelmelk *et al.*, 1997, Trends. 10 Microbiol. 5:70-73) are frequently found in stomach mucosa or stomach cancer.

Until now, the therapy has been restricted to gastrectomy and lymphadenectomy; however, due to the nevertheless poor prognosis, the need for a new accompanying therapy exists. Immunological studies have shown that even in cases in which the 15 immune system cannot effectively combat malignant cells, cellular and humoral activity is measurable, but is not sufficient to destroy the tumor cells. An effective approach now is to isolate the antibodies arising from the immune response of the patient, reproduce them in a suitable way, and use them therapeutically. Thus, for example, antibodies originating from patients having lung, esophageal, and colon 20 cancers are isolated and human monoclonal antibodies are derived therefrom, which, for example, directly influence differentiation and growth of the tumor cells.

Apoptosis is the programmed cell death, suicide of cells, through fragmentation of the DNA, cell shrinkage, and dilatation of the endoplasmic reticulum, followed by cell 25 fragmentation and the formation of membrane-bound vesicles, or apoptotic bodies. Apoptosis, the physiological form of cell death, guarantees rapid and clean removal of unnecessary cells, without triggering inflammation processes or tissue trauma, as in the case of necrosis. Under pathological conditions, it is also used for removing malignant cells, such as cancer precursor cells. It may be triggered through greatly 30 varying stimuli, such as through cytotoxic T-lymphocytes or cytokines, such as tumor necrosis factor, glucocorticoids, and antibodies. It is the most frequent cause of death of eukaryotic cells and occurs in embryogenesis, metamorphosis, and tissue atrophy. Apoptotic receptors on the cell surface, such as those of the NGF/TNF family, are

predominantly expressed on lymphocytes, but are also found on various other cell types, wherefore they are not suitable for cancer therapy. In particular, ligands and antibodies for these receptors have led to liver damage in *in vivo* tests. Therefore, tumor-specific receptors having apoptotic function are especially important.

5

In recent publications, we described that the human antibody 103/51, which was isolated from a stomach cancer patients with diffuse-type adenocarcinoma, cross-reacts with *H. pylori* and stomach cancer cells (Vollmers *et al.*, 1994, Cancer 74:1525-1532). In all assays, the known gastric adenocarcinoma cell line 23132 was 10 used, which is deposited under No. ACC201 at the DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig. In low doses, the antibodies have a mitotic effect on stomach cancer cells *in vitro*, in which they bind on a 130 kD membrane receptor (Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235). The antibody has some mitotic effect on stomach 15 carcinoma cells *in vitro* by binding to a 130 kD membrane receptor (Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235). Sequencing of the antibody variable gene regions identified the antibody 103/51 as an autoreactive antibody. Immunohistochemistry studies show that the antibody reacts strongly with stomach cancer cells and with glandular stomach cells.

20

The cellular receptor of monoclonal antibody 103/51 was previously unknown. In the course of the experiments leading to the present invention, we were able to identify this cellular receptor. However, this identification proved to be difficult. On one hand, the monoclonal antibody 103/51 reacts with its receptor during Western blot analysis 25 only under very specific stringency conditions. On the other hand, non-specific reactions are found with an array of further proteins, caused by denaturing artifacts.

Sequencing analyses have shown that the receptor corresponds to the CFR-1 protein, but is not identical to this protein. Furthermore, glycoprotein compounds which have 30 one or more determinants (ligands) corresponding to those of the known CFR-1 are thus claimed. In particular, a homology is required which is to be defined according to this application as a correspondence of at least 80% in the primary amino acid

sequences. The receptor is therefore an isoform to CFR-1. In addition, specific binding to either the human antibody 103/51 and/or the murine antibody 58/47-69 is required.

5 It is of special interest if the specific binding site on the glycoprotein is a carbohydrate residue, i.e., a sugar residue.

In a special embodiment, the CFR-1 protein has an amino acid sequence according to Appendix S, cell line 23132 as a determinant.

10

The cellular receptor of the antibody 103/51 is an isoform of the protein CFR-1, specific for tumor cells, particularly for gastric carcinoma cells, which does not occur in normal tissue. The specific receptor properties of this isoform are based on a special glycostructure linked to the protein backbone via an N-linkage. The tumor-specific receptor may be used in a screening method for identifying specific binding partners. According to the present invention, specific binding partners on the receptor are those compounds which bind selectively to a tumor-specific glycostructure of CFR-1 and preferably have the ability to induce apoptosis. These specific binding partners may be used for the production of therapeutic agents for the treatment of tumors and for the production of diagnostic agents.

20
The protein compound was characterized as an isoform of CFR-1 through purification, sequencing, and transfection. The specificity for the antigen 103/51 was confirmed by producing murine antibodies from purified molecules having identical reactions and functions, through immunohistochemical staining, and an MTT assay of two CFR-1 negative cell lines. The isoform of the CFR-1 molecule, which was detected by both the human and the murine antibodies, is localized in the cell membranes of the epithelial cells and has an expression pattern which differs from that previously described for CFR-1 (Burrus *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol. 12:5600-5609).

30
CFR-1, which was isolated as a high-affinity FGF-binding protein from chicken fibroblasts (Burrus *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol. 12:5600-5609), binds to a number of

FGFs and may have a role in the regulation of cellular proliferation. In Chinese hamster ovary cells (CHO), CFR-1 was found to be expressed only in the Golgi apparatus (Burrus *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol. 12:5600-5609), but it can also be secreted in a mutated form (Zuber *et al.*, 1997, J. Cell Physiol. 170:217-227).

5 Depending on the organism, two detected variants of CFR-1, ESL-1, and MG-160 share sequence homologies between 80% and 95% (Burrus *et al.*, 1992, Mol. Cell. Biol. 12:5600-5609; Stieber *et al.*, 1995, Exp. Cell Res. 219:562-570; Steegmaier *et al.*, 1995, Nature 373:615-620; Mourelatos *et al.*, 1996, DNA Cell Biol. 15:1121-1128) and do not appear to share any sequence homologies to other known proteins.

10 Function and cellular distribution of CFR-1 and the homologues is relatively unknown and contradictory. It has been shown that MG-160, which is a medial Golgi sialoglycoprotein and was purified from rat brains, plays a role in intracellular FGF trafficking (Zuber *et al.*, 1997, J. Cell Physiol. 170:217-227).

15 Recent findings have shown that the localization of this protein is not restricted to the Golgi apparatus. However, if truncated at the c-terminus, the protein can be localized to the plasma membrane and filopodia (Gonatas *et al.*, 1998, J. Cell Sci. 111:249-260). This is consistent with the finding that the third homologue, ESL-1, which was isolated from mouse neutrophilic progenitor cells (32Dcl3), is located in the Golgi apparatus as well on the cell surface of the microvilli (Steegmaier *et al.*, 1997, J. Cell Sci. 110:687-694, Gonatas *et al.*, 1998, J. Cell Sci. 111:249-260). ESL-1 was identified as ligand for E-selectin in neutrophils with an approximate molecular mass of 150 kD. Immunoprecipitation with anti ESL-1 antibodies showed that a non-defined isoform of this protein could be precipitated from various cells, including

20 some cancerous cell lines (Steegmaier *et al.*, 1995, Nature 373:615-620).

25

Because of the predominantly membranous distribution of CFR-1 in cancerous cells, we conclude that the described receptor is an isoform of CFR-1. A variable cellular distribution of CFR-1 and its homolog is probably responsible for the results cited and is a known phenomenon for other proteins (Smalheiser, 1996, Mol. Biol. Cell 7:1003-1014). An altered distribution might be caused by a different glycosylation pattern in malignant cells, which may lead to a transport to the plasma membrane.

The tissue distribution shows that the CFR-1 molecule is correlated with cellular activation and proliferation demonstrated by staining with antibody Ki67 (Ramires *et al.*, 1997, *J. Pathol.* 182:62-67). Normal stomach mucosa does not express this
5 receptor in a measurable amount, but *H. pylori* infiltrated epithelia and dysplastic epithelia have this antigen. Both tissues proliferate and may be precursors for gastric carcinoma.

To understand the high effectiveness, it is important to note that in contrast to the
10 structure of CFR-1, which is found in healthy cells, the characterized isoform is not found on healthy cells, but exclusively on rapidly proliferating cells, i.e., cells which rapidly divide, such as the tumor cells found in the growth and corresponding precursor stages. The function of the receptor is essentially based on it being used as an energy receptor for nutrition intake of the cells and having a dominant share
15 particularly in frequently dividing cells, such as carcinoma cells. It is to be expressly noted that this receptor will have applications not only in gastric carcinomas, but rather also for all epithelial tumors which have essentially the same reaction mechanisms. Besides gastric tumors, the existence of these receptors was proven in cancerous tissue of the following tumors: esophagus, stomach, intestines, rectum,
20 liver, gallbladder, pancreas, lungs, bronchi, breast, cervix, prostate, cardiac, Barrett's, ovary, and/or uterus. The antibodies effective on the tumors, which bind to the receptor according to the present invention, therefore have a targeted activity on the cancerous (and not the healthy) cells.

25 The glycoproteins of the receptor structure were able to be identified via their molecular mass of approximately 130 kD, the molecular mass able to be determined using a known method, for example, using gel electrophoresis. The term "approximately" is based on the fact, recognizable to one skilled in the art, that these types of size determinations are not exact in any way, but rather changes or variations
30 of the methods of the molecular size determination lead to variations in the measurement values.

The most significant field of application of the receptor is diagnosis and therapy. For prophylactic application, the receptor is administered to the patients in pharmaceutical doses, with the goal of stimulating antibodies, so that vaccination may be achieved with the aid of the receptor. The antibodies are responsible for removing any tumor
5 cells which arise.

However, the administration of the receptor if tumor cells are already present is also a possibility for medication. The administered receptors reinforce and amplify antibody formation and therefore are responsible for elevated apoptosis of the tumor cells or for
10 a complement-mediated lysis. The cells “starve,” since blocking of the receptor leads to growth arrest.

The assays up to this point have shown that the receptor has been proven particularly suitable for treating the following tumor precursors. In regard to illnesses of the
15 stomach, the receptor is suitable for treating dysplasia of the gastric mucosa and/or intestinal metaplasia of the stomach and/or for treating inflammation of the gastric mucosa which is associated with the bacteria *Helicobacter pylori* and for treating tubular and tubulovillous adenomas of the stomach. Application is also indicated for the following diseases of the colon, specifically tubular adenoma of the colon, villous
20 adenoma of the colon, and dysplasia in ulcerative colitis. The receptor is also suitable for Barrett’s dysplasia and Barrett’s metaplasia of the esophagus. The receptor is also suitable for treating the following diseases of the cervix: cervical intraepithelial neoplasia I, cervical intraepithelial neoplasia II, and cervical intraepithelial neoplasia III.

25 Finally, the receptor described above is also suitable for administration with squamous epithelial metaplasia and squamous epithelial dysplasia of the bronchus.

Due to the operative mechanisms described above, the receptor is suitable in principle
30 for treating tumors of the esophagus, the stomach, intestine, the rectum, the liver, gallbladder, pancreas, lungs, bronchi, breast, cervix, prostate, cardiac, Barrett’s, ovary, and/or uterus.

The application of the receptor for diagnosis purposes uses the ability of the antibody to bind to this receptor due to the specific antigen/antibody interaction. In this way, evidence for the existence, the localization, and/or the quantity of the corresponding antibodies may be derived from the ability to bind to the receptor. With the same reaction mechanisms, the binding ability may be used to detect the receptor.

Particularly if the antibodies are tumor antibodies, they may be used to detect the existence of tumors. In particular, it is possible to use the receptor as a tumor marker.

- 5 reaction mechanisms, the binding ability may be used to detect the receptor.
- 10 In a refinement, the receptor may be used to produce an antitumor agent, in which compounds that are potentially effective against tumors are assayed for their ability to specifically bind to the receptor and upon a positive result, i.e., upon the occurrence of binding, this compound is used for the pharmaceutical application. Of course, appropriate formulation and the addition of typical additives is necessary, as usual, for
- 15 producing a pharmaceutical which reaches the market.

It remains to be expressly stated that not only human antibodies come into consideration for the production of antitumor medications with the aid of the receptor as described above, but rather also mouse antibodies and/or humanized antibodies of

- 20 any arbitrary species. This is also true for antibody fragments such as Fab and F(ab)₂ and/or Fab' fragments, as are obtained through proteolytic cleavage of antibodies. These also include single strand antibodies and/or tetrameric and/or dimeric antibody forms and/or bispecific antibodies.
- 25 Furthermore, it is known that human tumor antigens which are immunogenic in mice are used for generating monoclonal mouse antibodies and are capable of specifically recognizing the human antigen and therefore are suitable for being used therapeutically in humans.

The object of the present invention is the establishment of the receptor structure and its use. However, the repeated injection of "foreign" antibodies and/or mouse antibodies into humans is problematic as it leads both to disadvantageous hypersensitivity reactions and to elevated clearance rate of the circulating antibodies,
5 so that the antibodies do not reach their target location.

For these reasons, reexamination of the therapeutic suitability of mouse antibodies is required. Nonetheless, the suitability in connection with diagnostic methods is unrestricted. The possibility of deriving humanized mouse antibodies and using them
10 for therapeutic purposes also exists. It is also decisive that not only existing tumors, but also pre-cancerous structures may be characterized with the aid of these diagnostic methods.

In addition to the receptor described above, protection is also claimed for a mouse
15 antibody which binds specifically thereto, whose structure is defined by Appendices A and B. The regions identical for all antibodies were not reproduced; those regions characteristic for the individual antibody were claimed and shown.

As a result, the receptor whose structure is described, which should be designated as
20 an isoform of CFR-1, enables the therapy and diagnosis not only of tumors, but also of pre-cancerous structures. In addition, the structure of a mouse antibody which binds specifically thereto is described.

Material and Methods

25

Cell culture and antibody purification

For all assays, the established stomach adenocarcinoma cell line 23132 (Hensel *et al.*,
1999, Int. J. Cancer 81:229-235) was used. Cells were grown to 80 % confluence in
RPMI-1640 (PAA, Vienna, Austria) supplemented with 10% FCS and
30 penicillin/streptomycin (1% for both). For the assays described, cells were detached
with trypsin/EDTA and washed twice with phosphate buffered saline (PBS) before

use. The human hybridoma cell line 103/51 was produced and grown as described (Vollmers *et al.*, 1994, Cancer 74:1525-1532). Purification of the IgM antibodies was performed as described elsewhere (Vollmers *et al.*, 1998, Oncol. Rep. 5:549-552).

5 Preparation of membrane extracts

Isolation of membrane proteins from tumor cells was performed as described by Hensel *et al.* (Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235), using cell line 23132. In short, confluent tumor cells were washed twice with PBS, harvested with a cellscraper and centrifuged, and resuspended in hypotonic buffer (20 mM HEPES, 3 mM KCl, 3 mM MgCl₂). After 15 min incubation on ice, followed by sonification for 5 min, the nuclei were pelleted by centrifugation at 10,000g for 10 min. The supernatant was centrifuged for 30 min at 100,000g in a swing-out rotor to pellet membranes. After washing the pellet with hypotonic buffer, it was resuspended in membrane lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, and 1% Triton X-100). A protease inhibitor (Boehringer, Mannheim, Germany) was added to all solutions.

Western blotting

10% reducing SDS-PAGE gels and Western blotting of proteins were performed using standard protocols as described elsewhere (Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235). In short, blotted nitrocellulose membranes were blocked with PBS containing 2% low fat milk powder, followed by 1 h incubation with 10 µg/ml purified antibody 103/51. The secondary antibody (peroxidase-coupled rabbit anti-human IgM antibody (Dianova, Hamburg, Germany)) was detected with the SuperSignal chemiluminescence kit from Pierce (KMF, St. Augustin, Germany). After three washings with PBS + 0.05% Tween-20, the second antibody (peroxidase-coupled rabbit antihuman IgM antibody (Dianova, Hamburg, Germany)) was incubated. The reaction was detected with the aid of the SuperSignal chemiluminescence kit from Pierce (KMF, St. Augustin, Germany).

30 Purification of the antigen 103/51

The purification of the antigens were performed by column chromatography using a Pharmacia (Freiburg, Germany) FPLC unit. For size exclusion chromatography, a Pharmacia Superdex 200 column (XK16/60) was loaded with 5 mg membrane

preparation and run with buffer A (100 mM Tris/Cl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 40 mM NaCl, 1% Triton X-100). Then, the eluate was fractionated and examined in Western blot analysis for reaction with antibody 103/51. Positive fractions were loaded on a MonoQ (5/5) column using buffer A. The bound proteins were eluted with a linear gradient using buffer B (100 mM Tris/Cl, pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% Triton X-100), fractionised and examined in Coomassie-stained SDS-PAGE and Western blot analysis. Positive bands were cut out from gel and sequenced or used for immunization of mice.

10 **MALDI peptide mapping**

The band of interest was excised and cut into small pieces of about 1 mm x 1 mm. Gel pieces were washed, reduced with DTT, S-alkylated with iodoacetamide, and in-gel digested with trypsin (unmodified, sequencing grade, Boehringer) as described elsewhere (Shevchenko *et al.*, 1996, Anal.Chem. 68:850-858). After 3 h of digestion 15 at 37°C, 0.3 µl of the digest solution was removed and subjected to MALDI peptide mass mapping on a Bruker Reflex MALDI-TOF equipped with delayed extraction (Bruker-Franzen, Bremen, Germany). The thin film technique was adopted for sample preparation (Jensen *et al.*, 1996, Rapid.Commun.Mass.Spectrom. 10:1371-1378). The tryptic peptide masses were used to search a non-redundant protein sequence database 20 by the PeptideSearch software program developed in-house.

Cloning of CFR-1 anti-sense vector and transfection

RNA isolation, cDNA synthesis, and PCR were performed as described (Hensel *et al.*, 1999, Int.J.Cancer 81:229-235). In short, for PCR for amplification of a 897 bp 25 fragment ranging from basepairs 802 to 1699, the following primers were used: CFR-For 5' GCTTGGAGAAAGGCCTGGTGAA 3', CFR-Rev 5' TGGCACTTGCAGTACAGGACAG 3'. Amplification was performed using the following cycle profile: 95°C, 2 min, followed by 35 cycles of 94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 60 sec, and a final extension of 72°C for 4 min. Cloning into the pCR- 30 Script Amp SK (+) vector and DNA sequencing were performed as described before (Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235). The insert was subcloned into the pHook-2 vector (Invitrogen, Leek, Netherlands), and cloning was controlled again by sequencing.

Transfection of cell line 23132 with pHOOK2-antiCFR-1 was accomplished with PrimeFector reagent (PQLab, Erlangen, Germany) according to supplier's manual. In short, plasmid DNA was diluted to 10 µg/ml and the prime factor reagent was added
5 in a 1:10 ratio to a serum-free growth medium. Diluted plasmid DNA (450 µl), diluted Primefector reagent (90 µl), and serumfree medium (460 µl) were mixed and incubated at RT. 60-milliliter cell culture plates (70% confluent) were washed two times with serumfree medium, and then the PrimeFector/DNA mixture was added dropwise. Cells were incubated 18 h at 37°C and 7% CO₂, then serumfree growth
10 medium was replaced with growth medium containing 10% FCS, and cells were incubated another 24 h before studying CFR-1 expression.

Flow cytometry

The cell line 23132 was detached from culture plates by trypsin /EDTA 48 h after
15 transfection, washed and subsequently incubated on ice with antibody 103/51 and human) isotype-matched control antibody (Chromopure human IgM) for 15 minutes, followed by incubation with a FITC-labeled rabbit anti-human IgM antibody (Dianova) for 15 minutes on ice. Antibodies were optimally diluted in PBS containing 0.01% sodiumazide. Cells were analyzed by flow cytometry (FACScan; Becton
20 Dickinson, USA).

Glycosidase assays

Detached and washed cells were resuspended in RPMI-1640 containing 10% FCS and incubated for 1 h on ice, then counted, and cytospins were prepared. After air-drying,
25 cytopspin preparations were acetone-fixed (10 min), washed, and incubated with 20 µU/ml O-glycosidase or 5 mU/ml N-glycosidase (Boehringer) for 4 h at 37°C. Then, slides were washed and immunohistochemically stained.

For deglycosylation of membranous proteins, membrane extracts were incubated for
30 16 h at 37°C with 1 mU/ml N-glycosidase diluted in deglycosylation buffer (50 mM PO₄-Buffer, pH 7.4). As a control, extracts were incubated with deglycosylation buffer alone. Then, extracts were separated by SDS-PAGE and Western blots were performed as described above.

Production of murine monoclonal antibodies

BALB/c mice were immunized two times within 17 days with 5 µg purified antigen of antibody 103/51, and killed 4 days after the second immunization. Spleens were
5 disrupted mechanically and fused with 1×10^7 NS0 cells as described earlier (Vollmers *et al.*, 1985, Cell 40:547-557). Antibody-producing hybridomas were tested through immunohistochemical staining and reaction in Western blot analysis. Clone 58/47-69 with positive reactivity was used for further experiments.

10 Immunohistochemical staining of paraffin sections

Paraffin-embedded human gastric mucosa and tumor were sectioned (5 µm), deparaffinized, and blocked with BSA (15 mg/ ml) diluted in PBS for 30 min. The sections were incubated with supernatant of hybridoma 103/51, or 58/47-69, Ki67 (Loxo, Dossenheim, Germany) or mouse anti-cytokeratin 8 antibody diluted 1:15 with
15 BSA/PBS (Dako, Hamburg, Germany) for 2 h in a humidified incubator. Then they were washed three times with Tris/NaCl, followed by incubation with peroxidase-labeled rabbit anti-human or rabbit anti-mouse conjugate (Dako) diluted 1:50 in PBS containing rabbit serum (for antibody 103/51) or in PBS containing human AB plasma (for antibody 58/47-69 and anti-cytokeratin). After washing three times with
20 Tris/NaCl and incubation in PBS for 10 min staining was performed with diaminobenzidine (0.05%)-hydrogen peroxide (0.02%) for 10 min at RT. The reaction was stopped under running tap water, and sections were counterstained with hematoxylin.

25 Immunohistochemical staining of living and acetone-fixed cells

For living cell staining, cells were detached, washed and diluted to 1×10^6 cells/ml. 1 ml of cell suspension was centrifuged at 1,500g for 5 min. Antibody diluted to 40 µg/ml with complete RPMI was added to a final volume of 1 ml and incubated for 90 min on ice. Then cells were pelleted at 1,500g for 5 min and resuspended with 500 µl
30 RPMI. With 200 µl of the cell suspension, cytocentrifuge preparations were prepared and air-dried for 30 min. Cells were fixed in acetone for 30 min and washed with

Tris/NaCl three times. HRP-coupled rabbit anti human IgM (DAKO) was diluted 1 : 50 in PBS/BSA (0,1 %) and incubated for 30 min at RT. After three washings, staining was performed as mentioned above.

5 For staining of acetone-fixed cells, cytospins were prepared, air-dried at RT and fixed in acetone as described above. Then, cytospins were blocked for 15 min with PBS/BSA (0.1 %) and incubated for 30 min with 10 µg/ml primary antibodies followed by three washings. Incubation with secondary antibody and staining was performed as described above.

10

MTT-proliferation assay

The MTT-assay with the established cell line 23132 was performed as described (Vollmers *et al.*, 1994, Cancer 74:1525-1532). In short, trypsinized cells were diluted to 1×10^6 cells/ml in complete growth medium, and 50 µl of cell suspension was added
15 to each well of a 96-well plate. Then 50 µl of the antibodies, diluted to the indicated concentrations with complete growth medium, were added to the wells, and plates were incubated for one or two days at 37°C in a humidified incubator. For measurement, 50 µl of MTT (3(4,5 dimethylthiazol)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) solution (5 mg/ml) were added to each well, and plates were incubated for
20 30 min. After incubation, plates were centrifuged at 800g for 5 min, MTT solution was removed, the stained cell pellet was dissolved in 150 µl dimethylsulphoxide, and absorption was measured at wavelengths of 540 nm and 690 nm.

Methods of determining the sequence of CFR-1

25

RNA was prepared for the cDNA synthesis with the aid of the RNeasy kit from Quiagen. For preparation, 1×10^6 cells were washed twice using ice cold PBS and pelletized at 1000 x g for 5 minutes and the RNA was prepared in accordance with the manufacturer description. 5 µg RNA (1-5 µl solution) was mixed with 1 µl oligo-dT₁₅
30 (1 µg/µl) and 2 µl random primer (40 µM) and filled up to a total volume of 8 µl using H₂O. The RNA was denatured for 10 minutes at 65°C and the sample was subsequently cooled on ice. 17 µl Mastermix, consisting of 5.2 µl DEPC-H₂O, 5 µl 5x

reverse transcriptase buffer, 2.5 µl dNTPs (per 10 mM), 2.5 µl DTT (250 mM), 0.8 µl RNasin (400 U), and 1 µl M-MLV reverse transcriptase (200 U), was then pipetted thereto. The synthesis of the cDNA was performed for 70 minutes at 37°C and was subsequently terminated by heating to 95°C for 5 minutes. 1-5 µl of the cDNA was
5 mixed with the PCR Mastermix and filled up to 25 µl total volume using H₂O. The PCR Mastermix consisted of 2.5 µl 10x Taq-polymerase buffer, 0.5 µl 10 mM NTPs, 1.5-2 µl 25 mM MgCl₂, 0.5 µl each 20 pM 3' and 5' primer, and 0.2 µl Taq polymerase (1 U). The amplification conditions for the various PCR products are listed in the following table.

10

Overview of the PCR program used for amplifying the various cDNAs

Product	Annealing in [°C]	MgCl ₂ [mM]	Extension time [seconds]	Cycles	Product size [bp]
Fragment 1	55	1.75	45	40	691
Fragment 2	60	1.5	45	40	898
CFR Fragment 3	55	2.0	45	40	739
Fragment 4	55	2.0	45	40	941
Fragment 5	55	2.0	45	40	750

Primer sequences

15 Sequences for the oligonucleotides used for the PCR

<u>CFR</u>				
CFR-For 1	5'	OGC AGC TTC AGC AGC AAC AGC A		3'
CFR-Rev 1	5'	CAG CTC AGC CAC CCG GAG AAT G		3'
CFR-For 2	5'	GCT TGG AGA AAG GCC TGG TGA A		3'
CFR-Rev 2	5'	TGG CAC TTG CGG TAC AGG ACA G		3'
CFR-For 3	5'	GAA CAC CGT CTC TTA GAG CTG C		3'
CFR-Rev 3	5'	GCT TCC TGC AGA GTG TCA TTG C		3'
CFR-For 4	5'	GGA GGA CGT GTT GAA GCT TTG C		3'
CFR-Rev 4	5'	CCA GGG CAC AAG CAG TAT GAA G		3'

CFR-For 5	5'	CAA CAG CAG ACA GGT CAG GTG G	3'
CFR-Rev 5	5'	CCG GAA GTT CTG TTG GTA TGA G	3'

The sequencing was performed using a sequencer from the firm Applied Biosystems.

5 The following oligos were used for the sequencing of cloned PCR products:

T ₃	5'	ATT TAA CCC TCA CTA AAG GG	3'
T ₇	5'	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	3'

10 3 µl plasmid DNA was mixed with 1 µl primer (3.2 pM), 11 µl H₂O, and 5 µl reaction mixture of the AbiPrism Sequencing Kit and incubated in the thermocycler for 25 cycles using the following parameters:

	<u>Denaturing</u>	<u>Annealing</u>	<u>Extension</u>
15	95°C, 30 seconds	52°C, 15 seconds	60°C, 4 min.

To remove oligos and dNTPs, the reaction mixture was purified via a Sephadex G-50 column. For this purpose, a 100 µl pipette tip was loaded up to the upper edge with column material and centrifuged for 3 minutes at 2000 x g. Subsequently the sample
20 was applied and the small column was centrifuged again. The DNA was then precipitated by 2 µl Na acetate (pH 5.2) and 50 µl 100% ethanol and pelletized by centrifuging at 13,000 x g for 15 minutes. After drying, the DNA was received in 3 µl formamide/25 mM EDTA (5:1) and analyzed in the sequencer.

25 **Analysis of the Sequencings**

At least five clones were sequenced from all clonings. In order to remove errors which arose during the amplification using the Taq-polymerase and/or the sequencing, the sequences of the cloned PCR fragments were compared with one
30 another with the aid of the DNAsis for Windows software and a consensus sequence of all clones was established from both read directions. By rewriting the DNA sequences into amino acid sequences, the number of silent mutations and amino acid

substitution mutations were determined. The sequences for MG160 and CFR were drawn from the NCBI databank and compared to sequencings of the PCR products using the DNAsis for Windows program.

5 Figures and Tables

Figures and Tables

Fig. 1: Identification of the antigen of antibody 103/51

a) Protein purification of the antigen from membrane extracts of stomach carcinoma cell line 23132. Membrane fractions were processed by chromatographic procedures and whole membrane fraction (lane 2), or purified proteins (lane 3) were stained with Coomassie (lane 1: 10 kDa ladder). Western blot analysis with antibody 103/51 on membrane fractions of cell line 23132 showed one reaction with a protein with a molecular mass of approximately 130 kD (lane 4). Specificity of processed membrane extracts was controlled by Western blotting with 103/51 (lane 5). The protein band indicated by the arrow was excised from a preparative gel and used for MALDI mass mapping and immunization of mice.

b) Identification of the 130 kDa gel-separated protein by high resolution MALDI peptide mass mapping. Peaks labeled with '*' match the calculated masses of tryptic peptides of U28811 human cysteine-rich fibroblast growth factor receptor (CFR-1) with a mass accuracy better than 50 ppm. Peaks labeled with 'T' correspond to trypsin autolysis products. The inset shows the mass resolution ($m/\Delta m = 9000$) of the peak at m/z 1707.818.

Fig. 2: Effect of CFR-1 antisense transfection on antibody 103/51 staining and live cell staining (Magnification 200x)

a) Cell line 23132 transiently transfected with control vector and acetone fixation shows intensive staining with antibody 103/51.

b) Reduced staining is visible in cells transiently transfected with CFR-1 antisense vector.

c) To reduce background staining in immunohistochemical staining, live cell staining was performed with cell line 23132. A clear membrane staining is visible.

5 d) Control live cell staining (only secondary antibody) on cell line 23132.

e) Negative live cell staining on cell line Colo-699 with antibody 103/51 indicates that this cell line is negative for expression of CFR-1.

f) Control live cell staining (only secondary antibody) on cell line Colo-699.

10 g) Flow cytometry of cell line 23132 with antibodies Chromopure human IgM (grey) and 103/51

h) Analysis of cells transfected with control vector pHOK-2 with flow cytometry 48 h after transfection.

i) Cells transfected with CFR-1 antisense vector shows a clear decrease in binding of antibody 103/51

15 **Fig. 3: Effect of deglycosylation on staining with antibody 103/51**

a) Cells (23132) incubated with deglycosylation buffer and acetone-fixed show intense staining with antibody 103/51.

b) Cells (23132) treated with N-glycosidase followed by acetone fixation show a clear reduction in staining.

20 c) Effect of deglycosylation of membrane extracts of cell line 23132 on reaction with antibody 103/51 in Western blot analysis. Extracts incubated for 16 h with deglycosylation buffer (Buffer) show no difference in staining to untreated extracts (Control). Incubation with N-glycosidase leads to a clear reduction in staining (N-glyco).

25

Fig. 4: Immunohistochemical staining with murine antibody 58/47-69 and 103/51 on stomach adenocarcinoma

To show identical specificity of antibody 103/51 and murine antibody 58/47-69, diffuse-type stomach adenocarcinoma was stained with haematoxinil-eosin (a), antibodies 103/51 (b) and 58/47-69 (c), and anti-cytokeratin 18 as a positive control. Identical staining in (c) and (d) indicates identical specificity (arrows = tumor cells).

Fig.5: Immunohistochemical staining of antibody 103/51 on different gastric tissues

Cryo-sections of gastric tissues were stained by HE, antibody Ki67 (to indicate proliferating cells) and antibody 103/51. (Magnification x100)

5 a) gastric tissue with inflammation
b) *H. pylori* induced gastritis (inlets shows magnification of marked glands.
c) Dysplasia
d) Gastric adenocarcinoma

10 **Fig. 6: Immunohistochemical staining with antibody 103/51 on different cancerous and normal tissues**

The staining of antibody 103/51 on the following tissues is shown: Carcinoma of the ampulla of Vater (a), mamma carcinoma invasive lobular (b), adenocarcinoma of the colon and no staining of normal beaker cell epithelium of the colon (c), hepatocellular carcinoma (d), glomerular and fascicular zones of the adrenal gland (e), collecting tubes of the kidney-specific staining of the Golgi apparatus (arrow) (f). Arrows in a - d indicate tumor cells, the red arrow in (c) = beaker cells, the arrow in (f) indicates Golgi apparatus (Magnification 400x, except (g) 200x).

20 **Fig. 7: Stimulation of cell lines with antibodies 103/51 and 58/47-69 determined by colorimetric MTT-assay**

25 a) Titration with purified antibody 103/51 shows an increase in stimulation up to 4 µg/ml. Higher concentrations do not lead to higher stimulation (c = Control, no antibody added).
b) A MTT-assay with equal concentrations (4 µg/ml) of purified antibodies 103/51 and 58/47-69 shows comparable stimulation of tumor cell 23132 after one or two days of incubation (Control 1 = chromopure human IgM, Control 2, uncorrelated mouse IgM).
30 c) Cell line 23132 was transiently transfected with control vector pHOOK-2 or CFR-1 antisense vector, incubated for 24 h, and tested in the MTT assay for stimulation with 4 µg/ml purified antibody 103/51 after 24 h. Untransfected cells were also incubated as control (Control, uncorrelated human IgM).

d) A MTT-assay, with equal concentrations (4 µg/ml) of antibody 103/51, on different epithelial tumor cell lines shows stimulation only on the CFR-1-positive cell line 23132 24 h after addition of antibody. CFR-1-negative cell lines Colo-699 and EPLC-272H do not show any stimulation by antibody
5 103/51.

Tab. 1: Reaction pattern of antibody 103/51 with different tissues

Antibody staining was scored as followed: - = no staining, + = moderate staining,

10 ++ = intensive staining. HCC = hepatocellular carcinoma, ¹ Proliferation zone, Glandular foveola, ² Glomerular, fascicular zone (membranous staining), ³ Collecting tubes of the endoplasmatic reticulum.

Appendix A

15 **Appendix B**

Appendix S: comparison of the amino acid sequences of the CFR-1 obtained from cell line 23132 to the sequences of CFR-1 and MG160 already published.

These experimental comparisons primarily show that the CFR-1 protein obtained from cell line 23132 is not identical to the CFR-1 sequences previously known, but
20 represents an isoform thereof. In addition to the differences in relation to the previously known and published CFR-1 and MG160, the amino acid sequence is seen as a special embodiment of the generally claimed receptor and is uniquely characterized by the first and specially identified positions.

25 **Results**

Purification and identification of antigen 103/51

Western Blot analysis was used to show that the antibody 103/51 binds to an approximately 130 kD membrane protein on stomach cancer cells. We prepurified this
30 protein by sequential size exclusion and anion exchange chromatography (Fig. 1 a). The protein was excised from a Coomassie-stained preparative SDS-PAGE, one part was used for production of mouse monoclonal antibodies (see below), and one part was used to identify the protein using the method outlined by Shevchenko et al.

(1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:14440-14445). After 3 h of *in-gel* digestion with trypsin, about 1% of the total digested volume was removed and subjected to high mass accuracy MALDI peptide mass mapping (saving the rest of the digest for nanoelectrospray analysis, in case MALDI MS did not lead to definitive identification). Despite the femtomole amount of the protein digest consumed for MALDI analysis, a database search matched 35 peptides to the CFR-1 sequence with a mass accuracy within 50 ppm. These peptides cover 29% of the CFR-1 sequence, thus definitively identifying the protein, which has a calculated molecular weight of approximately 134 kD (Burrus *et al.*, 1992, Mol. Cell Biol. 12:5600-5609) (Fig. 1 b).

10

Effect of transient transfection of cell line 23132 with CFR antisense vector on binding of antibody 103/51 and live cell staining

We investigated the effect of an antisense transfection of the stomach carcinoma cell line 23132 using immunohistochemistry and flow cytometry. For this, an 897 bp 15 PCR-fragment of CFR, flanking the region between basepairs 802 and 1699, was cloned into the pHOOK-2 vector in an antisense direction in reference to the CMV promoter. The washed cells were transfected with the pHOOK-CFR anti-sense vector, pHOOK-lacZ, and pHOOK vector in an intermediate step. Transfection was controlled by a β -Galactosidase assay (data not shown). 48 h after transfection, 20 cyospin preparations were prepared and stained with antibodies 103/51 and anti-cytokeratin 18 as a control (data not shown).

The immunohistochemistry showed a clear reduction of staining in cells transfected with the pHOOK-CFR antisense vector when compared to mock-transfected cells 25 (Fig. 2 a - b). This confirmed the binding of antibody 103/51 to CFR-1. The slight cytoplasmatic staining visible in both stainings might be due to nonspecific binding often observed in staining with human IgM antibodies on acetone-fixed cells. Membrane expression and the effect of transfection were also tested by flow cytometry. (Fig. 2 g – i). The data indicates a reduction in binding of the antibody 30 103/51 after transfection of cells with the CFR-1 antisense vector. However, untreated cells or cells transfected with the controlvector pHOOK-2 shows a clear binding to cell line 23132, indicating expression of CFR-1 on the cell membrane.

To investigate the specific membrane distribution of the CFR-1 isoform, we performed live cell staining with cell line 23132 and some non-stomach cancer cell lines. On the cell line 23132 we found a clear staining (Fig. 2 c, d), while the human lung adenocarcinoma cell lines Colo-699 (Fig. 2 e, f) and human epidermoid lung carcinoma cell line EPLC-272H (data not shown) were clearly negative. This data show that the described CFR-1 isoform is not expressed in all cancerous cell lines, and the exclusive membrane staining of 23132 cells indicates that the CFR-1 isoform seems to have a distribution different from the one described so far for CFR-1.

10

Glycosidase assay

CFR-1 is a sialoglycoprotein with 5 possible N-glycosylation sites, and it has been shown by treatment with glycosidase F that the molecule is glycosylated at these sites (Steegmaier *et al.*, 1995, *Nature* 373:615-620). Since tumor-reactive antibodies often react with carbohydrate residues, we investigated whether this is the case for the antibody 103/51. Cytospin preparations of cell line 23132 were incubated for 4 h with O- and N-glycosidases, and then subjected to immunohistochemical staining with antibody 103/51. Treatment of cells with N-glycosidase led to a dramatic decrease in 103/51 staining (Fig. 3 b), while incubation with dephosphorylation buffer (Fig. 3 a) or digestion with O-glycosidase (data not shown) had no effect on binding of the antibody 103/51. This shows that the specificity of binding of the antibody 103/51 must be located in sugar residues and not in the primary protein sequence.

25 To further control for this effect, membrane extracts of cell line 23132 were deglycosylated for 16 h and Western blots were prepared and stained with antibody 103/51. We found a reduction in the reaction on lysates incubated with N-glycosidase when compared to the control lysates (Fig. 3 c).

30 **Production of murine antibodies and immunohistochemical staining of paraffin section of stomach adenocarcinoma**

Since commercial antibodies to CFR-1 are not available, we immunized mice with purified protein eluted from Coomassie-stained SDS-gel for production of

monoclonal antibodies to strengthen the specificity, and to further characterize CFR-1 expression. Spleen cells were immortalized by fusion with the heteromyeloma NS0. 150 clones were tested for immunohistochemical staining. Positive clones were recloned, and the clone 58/47-49 (IgM) was used for further characterization. To 5 investigate the binding properties of the human antibody 103/51 and the murine antibody 58/47-69, we stained paraffin sections of 15 different stomach adenocarcinoma and one adenoma. Identical staining of glandular cells of the normal epithelial tissue and intensive staining of carcinoma cells was found (Fig. 4). In short, early carcinoma ($n = 2$) were stained by both antibodies. On intestinal-type carcinoma 10 both antibodies stained 4 out of 5 cases, on diffuse-type carcinoma all cases ($n = 4$) were stained, and the intermediary-type were positive in 50 % ($n = 4$) with both antibodies. These results show a high expression of CFR-1 in most cases of stomach carcinoma. The investigated adenoma showed a distinct staining pattern, with positive cells only in the transition from normal to transformed cells.

15

Immunohistochemical staining with antibody 103/51 on gastric mucosa

To investigate the reaction pattern of antibody 103/51 on gastric mucosa in more detail, we performed immunohistochemical stainings on gastric tissue without inflammation, *H. pylori* associated chronic active gastritis, high-grade dysplasia and 20 gastric adenocarcinoma. On non-inflamed gastric tissue no reaction was seen (Fig. 5). However, in the mucosa of a patient with *H. pylori* gastritis we found staining predominantly in the basal zone of foveolar cells. The staining pattern of antibody 103/51 shows a strong correlation with the activation pattern shown by Ki67 staining (Ramires *et al.*, 1997, J. Pathol. 182:62-67). A more intensive staining of antibody 25 103/51 was seen in the proliferation zone of gastric dysplasia also correlating with Ki67 staining. The strongest staining was found in the proliferating zone of gastric adenocarcinoma.

30 Immunohistochemical staining of antibodies 103/51 and 58/47-69 on different tissues

We investigated the expression of CFR-1 in other cancerous and normal tissues by immunohistochemical staining of paraffin sections with antibodies 103/51 and 58/47-69. Out of 15 cancerous tissues (different from stomach carcinoma), antibody 103/51

showed staining in 13 cases (Fig. 6, Tab. 1a). Negative staining was observed on anaplastic cells of the lung, confirming the results from the immunohistochemical staining and MTT-assay with the cell lines Colo-699 and EPLC-272H. This data indicates an overexpression of CFR-1 and distribution to the cell membrane in
5 malignant transformed cells. On 28 normal tissues tested, we found a restricted expression only on three intestinal organs (Tab. 1 b). Membrane staining was observed on the glandular foveola of the stomach and the glomerular and fascicular zones of the adrenal gland, while staining of the Golgi apparatus was found in the collecting tubes of the kidney (Fig. 5). This further confirms the characterization of
10 the antigen as CFR-1, that has been described earlier by Burnus et al. (1992, Mol. Cell Biol. 12:5600-5609).

Stimulation with human and murine monoclonal antibodies

As stated in our previous publications (Vollmers *et al.*, 1994, Cancer 74:1525-1532;
15 Hensel *et al.*, 1999, Int. J. Cancer 81:229-235), the antibody 103/51 leads to the stimulation of cell line 23132 *in vitro*. We measured this stimulation of antibody 103/51 using the mitochondrial hydroxylase assay (MTT), which is a standard assay for proliferation (Carmichael *et al.*, 1987, Cancer Res. 47:936-942). To further investigate the stimulating properties of antibody 103/51, we incubated the cell line
20 23132 with various concentrations of purified antibody. We found a concentration-dependent stimulation with the highest activity at 4 µg/ml (Fig. 7 a). Higher concentrations showed a slight decrease in stimulation.

To test if the murine antibody 58/47-69 has the same effects on cell growth, we
25 performed the MTT-stimulation assay with purified antibodies in comparable amounts. As it can be seen in Fig. 7 b, both antibodies lead to the stimulation of cell line 23132 *in vitro*. This further confirms identical specificity of both antibodies.

To confirm that the stimulation of antibody 103/51 and the murine antibody 58/47-69
30 is mediated by binding to CFR-1, we transfected cells with control vector pHOOK-2 and CFR-1 antisense vector and tested transfected cells in the MTT-assay. As a positive control for transfection, cells were also transfected with pHOOK-2-lacZ vector followed by β-galactosidase staining (data not shown). Since comparable

stimulation was observed in nontransfected cells and cells transfected with control vector pHOOK-2, a reduction of the stimulating effect of both antibodies by the transfection procedure can be excluded. In contrast, cells transfected with CFR-1 antisense vector clearly show a reduced stimulation (Fig. 7 c).

5

Finally, to demonstrate that the stimulation by antibody 103/51 is not mediated by receptors other than CFR-1, we performed a MTT-stimulation assay with cell line the 23132 and compared it with the CFR-1-negative lung carcinoma cell lines Colo-699 and EPLC-272H. While the cell line 23132 is stimulated as described above, the two 10 lung carcinoma cell lines do not show any stimulation by antibody 103/51 (Fig. 7 d), confirming the results observed in the immunohistochemistry.

Patent Claims

What is claimed is:

1. Receptor on the surface membrane of strongly proliferating cells, particularly of gastric carcinoma, which is made up of glycoproteins,
characterized in that at least one determinant of the glycoprotein corresponds to a determinant of the CFR-1 protein; and the human antibody 103/51 and/or the murine antibody 58/47-69 (IgM) binds specifically to the glycoprotein.
2. Receptor according to Claim 1,
characterized in that the specific binding site on the glycoprotein is a carbohydrate residue (= sugar residue).
3. Receptor according to Claim 1,
characterized in that the primary amino acid sequence of the glycoprotein corresponds at least 80% to that of CFR-1 (is homologous).
4. Receptor according to Claim 1,
characterized in that the determinants of the glycoprotein have the amino acid sequence reproduced in Appendix S, cell line 23132.
5. Receptor according to one of Claims 1 to 4,
characterized by a molecular mass of approximately 130 kD.
6. Use of the receptor according to one of the preceding claims,
characterized in that the receptor is administered *in vivo* to induce the formation of antibodies.
7. Use of the receptor according to one of the preceding claims for the treatment of tumors,
characterized in that the receptor is administered before (for prophylaxis) or with the outbreak of the illness (for therapy).

8. Use of the receptor according to one of the preceding claims for the treatment of the following tumors: esophagus, stomach, intestine, rectum, liver, gallbladder, pancreas, lung, bronchi, breast, cervix, prostate, cardiac, Barrett's, ovary, and/or uterus.

9. Use of the receptor according to one of the preceding claims for the treatment of the following tumor precursors:

of the stomach:

- dysplasia of the gastric mucosa
- intestinal metaplasia of the stomach
- *Helicobacter pylori*-associated gastritis
- tubular and tubulovillous adenoma of the stomach

of the large intestine:

- tubular adenoma of the colon
- villous adenoma of the colon
- dysplasia in ulcerative colitis

in the esophagus:

- Barrett's dysplasia of the esophagus
- Barrett's metaplasia of the esophagus

of the cervix:

- cervical intraepithelial neoplasia I
- cervical intraepithelial neoplasia II
- cervical intraepithelial neoplasia III

of the lungs:

- squamous epithelial metaplasia of the bronchus
- squamous epithelial dysplasia of the bronchus.

10. Use of the receptor according to one of the preceding claims for diagnostic purposes,
characterized in that evidence for the existence, the localization, and/or the quantity of the corresponding antibodies and/or receptors is obtained via the ability of antibodies to bind to the receptor.

11. Use according to Claim 10,
characterized in that the antibodies are tumor antibodies.

12. Use according to Claim 10,
characterized in that the receptor is a tumor marker.

13. Method of extracting the receptor according to one of the preceding claims,
characterized by the following steps:

- a) preparation of membrane proteins from cells of the human adenocarcinoma cell line 23132
- b) performing size exclusion chromatography and
- c) anion exchange chromatography and
- d) finally extraction through preparative SDS-PAGE.

14. Murine mouse antibody 58/47-69 for use in one of the preceding claims and a structure which is characterized by the following features:
the variable region of the heavy chain is homologous to IGHV 1S 125* 01 according to Appendix A, the D segment being homologous to IGHD-ST 4*01 and the J segment being homologous to IGHJ4*01, and the variable region of the light chain has a structure according to Appendix B, which is homologous to IGKV-17*01, the J segment being homologous to IGKJ2*01.

15. Method of producing an antitumor agent using receptors according to one of the preceding claims,

characterized in that a compound with potential antitumor activity is tested for its ability to specifically bind to receptors according to one of the preceding claims and, in the event of a positive result, this compound is formulated for pharmaceutical administration and provided with typical additives for this purpose.

16. Method of producing an antitumor agent using receptors according to Claim 15,

characterized in that the compounds are human antibodies and/or mouse antibodies and/or humanized mouse antibodies and/or Fab and F(ab)₂ and Fab' fragments and/or single strand antibodies and/or tetrameric and/or dimeric antibody forms and/or bispecific antibodies.

Abstract of the Disclosure

Receptor, its use, and mouse antibody

A receptor on the surface membrane of strongly proliferating cells, particularly of gastric carcinoma, which is constructed from glycoproteins, at least one determinant of the glycoprotein corresponding to a determinant of the CFR-1 protein and the human antibody 103/51 and/or the murine antibody 58/47-69 (IgM) specifically binding on the glycoprotein.

Appendix A

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad

Prof. Dr. Vollmers, Heinz

Dr. Hensel, Frank

<112> Receptor, its use, and mouse antibody

<141> 03/09/02

<211> 288 bp

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<220> sequence of the variable region of the heavy chain (V_H) of the antibody
NM58-49/69

<221> V region

<222> (1)...(288)

<400>

tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc act gac tac tat ata aac tgg gtg aag cag
agg 60
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln
Arg
1 5 10 15
20

act gga cag ggc ctt gag tgg att gga gag att tat cct gga agt ggt aat act tac
tat
Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr
Tyr
25 30 35
40

aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc aca gcc
tat
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
Tyr
45 50 55
60

atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat ttc tgt gca aga tcg
gga
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ser
Gly
50 55 60
65

120

180

240

tta cga ccc tat gct atg gac tac tgg ggt caa gga acc tca gtc acc
Leu Arg Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
70 75 80

288

Appendix B

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad

Prof. Dr. Vollmers, Heinz

Dr. Hensel, Frank

<112> Receptor, its use, and mouse antibody

<141> 03/09/02

<211> 315 bp

<212> DNA

<213> Mus Musculus

<220> sequence of the variable region of the light chain (V_L) of the antibody
NM58-49/69

<221> V region

<222> (1)...(315)

<400>

cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt
cag 60
Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
Gln
1 5 10 15
20

agc att gta cat agt aat gga aac acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca ggc
cag 120
Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
Gln
25 30 35
40

tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg
ttc 180
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
Phe
45 50 55
60

agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag
gat 240
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
Asp
65 70 75
80

ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg
acc 300
Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
Thr
85 90 95
100
aag ctg gaa ata aaa
315
Lys Leu Glu Ile Lys
105

Appendix S

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad

Prof. Dr. Vollmers, Heinz

Dr. Hensel, Frank

<112> Receptor, its use, and mouse antibody

<141> 03/09/02

<211> 3114

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220> cystine-rich FGF receptor of the gastric carcinoma cell line 23132

<221> CDS

<222> (450)...(3563)

<400>

450 GAT GTG AGG GAG CCT GAA AAT GAA ATT TCT TCA GAC TGC AAT CAT TTG TTG
TGG AAT TAT

Asp Val Arg Glu Pro Glu Asn Glu Ile Ser Ser Asp Cys Asn His Leu Leu
Trp Asn Tyr

143 145 150 155

160

509

AAG CTG AAC CTA ACT ACA GAT CCC AAA TTT GAA TCT GTG GCC AGA GAG GTT
TGC AAA TCT

Lys Leu Asn Leu Thr Thr Asp Pro Lys Phe Glu Ser Val Ala Arg Glu Val
Cys Lys Ser

165 170 175

180

569

ACT ATA ACA GAG ATT GAA GAA TGT GCT GAT GAA CCG GTT GGA AAA GGT TAC
ATG GTT TCC

Thr Ile Thr Glu Ile Glu Glu Cys Ala Asp Glu Pro Val Gly Lys Gly Tyr
Met Val Ser

185 190 195

200

629

TGC TTG GTG GAT CAC CGA GGC AAC ATC ACT GAG TAT CAG TGT CAC CAG TAC
ATT ACC AAG

Cys Leu Val Asp His Arg Gly Asn Ile Thr Glu Tyr Gln Cys His Gln Tyr
Ile Thr Lys

205 210 215

220

689

ATG ACG GCC ATC ATT TTT AGT GAT TAC CGT TTA ATC TGT GGC TTC ATG GAT
GAC TGC AAA 749
Met Thr Ala Ile Ile Phe Ser Asp Tyr Arg Leu Ile Cys Gly Phe Met Asp
Asp Cys Lys
225 230 235
240

AAT GAC ATC AAC ATT CTG AAA TGT GGC AGT ATT CGG CTT GGA GAA AAG GAT
GCA CAT TCA 809
Asn Asp Ile Asn Ile Leu Lys Cys Gly Ser Ile Arg Leu Gly Glu Lys Asp
Ala His Ser
245 250 255
260

CAA GGT GAG GTG GTA TCA TGC TTG GAG AAA GGC CTG GTG AAA GAA GCA GAA
GAA AGA GAA 869
Gln Gly Glu Val Val Ser Cys Leu Glu Lys Gly Leu Val Lys Glu Ala Glu
Glu Arg Glu
265 270 275
280

CCC AAG ATT CAA GTT TCT GAA CTC TGC AAG AAA GCC ATT CTC CGG GTG GCT
GAG CTG TCA 929
Pro Lys Ile Gln Val Ser Glu Leu Cys Lys Lys Ala Ile Leu Arg Val Ala
Glu Leu Ser
285 290 295
300

TCG GAT GAC TTT CAC TTA GAC CGG CAT TTA TAT TTT GCT TGC CGA GAT GAT
CGG GAG CGT 989
Ser Asp Asp Phe His Leu Asp Arg His Leu Tyr Phe Ala Cys Arg Asp Asp
Arg Glu Arg
305 310 315
320

TTT TGT GAA AAT ACA CAA GCT GGT GAG GGC AGA GTG TAT AAG TGC CTC TTT
AAC CAT AAA 104
Phe Cys Glu Asn Thr Gln Ala Gly Glu Gly Arg Val Tyr Lys Cys Leu Phe
Asn His Lys
325 330 335
340

TTT GAA GAA TCC ATG AGT GAA AAG TGT CGA GAA GCA CTT ACA ACC CGC CAA
AAG CTG ATT 110
Phe Glu Glu Ser Met Ser Glu Lys Cys Arg Glu Ala Leu Thr Thr Arg Gln
Lys Leu Ile
345 350 355
360

GCC CAG GAT TAT AAA GTC AGT TAT TCA TTG GCC AAA TCC TGT AAA AGT GAC
TTG AAG AAA 116
Ala Gln Asp Tyr Lys Val Ser Tyr Ser Leu Ala Lys Ser Cys Lys Ser Asp
Leu Lys Lys
365 370 375
380

TAC CGG TGC AAT GTG GAA AAC CTT CCG CGA TCG CGT GAA GCC AGG CTC TCC
 TAC TTG TTA 122
 Tyr Arg Cys Asn Val Glu Asn Leu Pro Arg Ser Arg Glu Ala Arg Leu Ser
 Tyr Leu Leu
 385 390 395
 400

ATG TGC CTG GAG TCA GCT GTA CAC AGA GGG CGA CAA GTC AGC AGT GAG TGC
 CAG GGG GAG 128
 Met Cys Leu Glu Ser Ala Val His Arg Gly Arg Gln Val Ser Ser Glu Cys
 Gln Gly Glu
 405 410 415
 420

ATG CTG GAT TAC CGA CGC ATG TTG ATG GAA GAC TTT TCT CTG AGC CCT GAG
 ATC ATC CTA 134
 Met Leu Asp Tyr Arg Arg Met Leu Met Glu Asp Phe Ser Leu Ser Pro Glu
 Ile Ile Leu
 425 430 435
 440

AGC TGT CGG GGG GAG ATT GAA CAC CAT TGT TCC GGA TTA CAT CGA AAA GGG
 CGG ACC CTA 140
 Ser Cys Arg Gly Glu Ile Glu His His Cys Ser Gly Leu His Arg Lys Gly
 Arg Thr Leu
 445 450 455
 460

CAC TGT CTG ATG AAA GTA GTT CGA GGG GAG AAG GGG AAC CTT GGA ATG AAC
 TGC CAG CAG 146
 His Cys Leu Met Lys Val Val Arg Gly Glu Lys Gly Asn Leu Gly Met Asn
 Cys Gln Gln
 465 470 475
 480

GCG CTT CAA ACA CTG ATT CAG GAG ACT GAC CCT GGT GCA GAT TAC CGC ATT
 GAT CGA GCT 152
 Ala Leu Gln Thr Leu Ile Gln Glu Thr Asp Pro Gly Ala Asp Tyr Arg Ile
 Asp Arg Ala
 485 490 495
 500

TTG AAT GAA GCT TGT GAA TCT GTA ATC CAG ACA GCC TGC AAA CAT ATA AGA
 TCT GGA GAC 158
 Leu Asn Glu Ala Cys Glu Ser Val Ile Gln Thr Ala Cys Lys His Ile Arg
 Ser Gly Asp
 505 510 515
 520

CCA ATG ATC TTG TCG TGC CTG ATG GAA CAT TTA TAC ACA GAG AAG ATG GTA
 GAA GAC TGT 164
 Pro Met Ile Leu Ser Cys Leu Met Glu His Leu Tyr Thr Glu Lys Met Val
 Glu Asp Cys
 525 530 535
 540

GAA CAC CGT CTC TTA GAG CTG CAG TAT TTC ATC TCC CGG GAT TGG AAG CTG
 GAC CCT GTC 170
 Glu His Arg Leu Leu Glu Leu Gln Tyr Phe Ile Ser Arg Asp Trp Lys Leu
 Asp Pro Val
 545 550 555
 560

 CTG TAC CGC AAG TGC CAG GGA GAC GCT TCT CGT CTT TGC CAC ACC CAC GGT
 TGG AAT GAG 176
 Leu Tyr Arg Lys Cys Gln Gly Asp Ala Ser Arg Leu Cys His Thr His Gly
 Trp Asn Glu
 565 570 575
 580

 ACC AGC GAA TTT ATG CCT CAG GGA GCT GTG TTC TCT TGT TTA TAC AGA CAC
 GCC TAC CGC 182
 Thr Ser Glu Phe Met Pro Gln Gly Ala Val Phe Ser Cys Leu Tyr Arg His
 Ala Tyr Arg
 585 590 595
 600

 ACT GAG GAA CAG GGA AGG AGG CTC TCA CGG GAG TGC CGA GCT GAA GTC CAA
 AGG ATC CTA 188
 Thr Glu Glu Gln Gly Arg Arg Leu Ser Arg Glu Cys Arg Ala Glu Val Gln
 Arg Ile Leu
 605 610 615
 620

 CAC CAG CGT GCC ATG GAT GTC AAG CTG GAT CCT GCC CTC CAG GAT AAG TGC
 CTG ATT GAT 194
 His Gln Arg Ala Met Asp Val Lys Leu Asp Pro Ala Leu Gln Asp Lys Cys
 Leu Ile Asp
 625 630 635
 640

 CTG GGA AAA TGG TGC AGT GAG AAA ACA GAG ACT GGA CAG AAG CTG GAG TGC .*.
 CTT CAG GAC 200
 Leu Gly Lys Trp Cys Ser Glu Lys Thr Glu Thr Gly Gln Lys Leu Glu Cys
 Leu Gln Asp
 645 650 655
 660

 CAT CTG GAT GAC TTA GTG GTG GAG TGT AGA GAT ATA GTT GGC AAC CTC ACT
 GAG TTA GAA 206
 His Leu Asp Asp Leu Val Val Glu Cys Arg Asp Ile Val Gly Asn Leu Thr
 Glu Leu Glu
 665 670 675
 680

 TCA GAG GAT ATT CAA ATA GAA GCC TTG CTG ATG AGA GCC TGT GAG CCC ATA
 ATT CAG AAC 212
 Ser Glu Asp Ile Gln Ile Glu Ala Leu Leu Met Arg Ala Cys Glu Pro Ile
 Ile Gln Asn
 685 690 695
 700

TTC TGC CAC GAT GTG GCA GAT AAC CAG ATA GAC TCC GGG GAC CTG ATG GAG
TGT CTG ATA

218

Phe Cys His Asp Val Ala Asp Asn Gln Ile Asp Ser Gly Asp Leu Met Glu
Cys Leu Ile
705 710 715
720

CAG AAC AAA CAC CAG AAG GAC ATG AAC GAG AAG TGT GCC ATC GGA GTT ACC
CAC TTC CAG

224

Gln Asn Lys His Gln Lys Asp Met Asn Glu Lys Cys Ala Ile Gly Val Thr
His Phe Gln
725 730 735
740

CTG GTG CAG ATG AAG GAT TTT CGG TTT TCT TAC AAG TTT AAA ATG GCC TGC
AAG GAG GAC

230

Leu Val Gln Met Lys Asp Phe Arg Phe Ser Tyr Lys Phe Lys Met Ala Cys
Lys Glu Asp
745 750 755
760

G TG TTG AAG CTT TGC CCA AAC ATA AAA AAG AAG GTG GAC GTG GTG ATC TGC
CTG AGC ACG

236

Val Leu Lys Leu Cys Pro Asn Ile Lys Lys Val Asp Val Val Ile Cys
Leu Ser Thr
765 770 775
780

ACC GTG CGC AAT GAC ACT CTG CAG GAA GCC AAG GAG CAC AGG GTG TCC CTG
AAG TGC CGC

242

Thr Val Arg Asn Asp Thr Leu Gln Glu Ala Lys Glu His Arg Val Ser Leu
Lys Cys Arg.
785 790 795
800

AGG CAG CTC CGT GTG GAG GAG CTG GAG ATG ACG GAG GAC ATC CGC TTG GAG
CCA GAT CTA

248

Arg Gln Leu Arg Val Glu Glu Leu Glu Met Thr Glu Asp Ile Arg Leu Glu
Pro Asp Leu
805 810 815
820

TAC GAA GCC TGC AAG AGT GAC ATC AAA AAC TTC TGT TCC GCT GTG CAA TAT
GGC AAC GCT

254

Tyr Glu Ala Cys Lys Ser Asp Ile Lys Asn Phe Cys Ser Ala Val Gln Tyr
Gly Asn Ala
825 830 835
840

CAG ATT ATC GAA TGT CTG AAA GAA AAC AAG AAG CAG CTA AGC ACC CGC TGC
CAC CAA AAA

260

Gln Ile Ile Glu Cys Leu Lys Glu Asn Lys Lys Gln Leu Ser Thr Arg Cys
His Gln Lys
845 850 855
860

GTA TTT AAG CTG CAG GAG ACA GAG ATG ATG GAC CCA GAG CTA GAC TAC ACC
CTC ATG AGG 266
Val Phe Lys Leu Gln Glu Thr Glu Met Met Asp Pro Glu Leu Asp Tyr Thr
Leu Met Arg
865 870 875
880

GTC TGC AAG CAG ATG ATA AAG AAG TTC TGT CCG GAA GCA GAT TCT AAA ACC
ATG TTG CAG 272
Val Cys Lys Gln Met Ile Lys Lys Phe Cys Pro Glu Ala Asp Ser Lys Thr
Met Leu Gln
885 890 895
900

TGC TTG AAG CAA AAT AAA AAC AGT GAA TTG ATG GAT CCC AAA TGC AAA CAG
ATG ATA ACC 278
Cys Leu Lys Gln Asn Lys Asn Ser Glu Leu Met Asp Pro Lys Cys Lys Gln
Met Ile Thr
905 910 915
920

AAG CGC CAG ATC ACC CAG AAC ACA GAT TAC CGC TTA AAC CCC ATG TTA AGA
AAA GCC TGT 284
Lys Arg Gln Ile Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Arg Leu Asn Pro Met Leu Arg
Lys Ala Cys
925 930 935
940

AAA GCT GAC ATT CCT AAA TTC TGT CAC GGT ATC CTG ACT AAG GCC AAG GAT GAT
TCA GAA 2909
Lys Ala Asp Ile Pro Lys Phe Cys His Gly Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asp Asp
Ser Glu
945 950 955 960

TTA GAA GGA CAA GTC ATC TCT TGC CTG AAG CTG AGA TAT GCT GAC CAG CGC CTG
TCT TCA 2969
Leu Glu Gly Gln Val Ile Ser Cys Leu Lys Leu Arg Tyr Ala Asp Gln Arg Leu
Ser Ser
965 970 975 980

GAC TGT GAA GAC CAG ATC CGA ATC ATT ATC CAG GAG TCC GCC CTG GAC TAC CGC
CTG GAT 3029
Asp Cys Glu Asp Gln Ile Arg Ile Ile Ile Gln Glu Ser Ala Leu Asp Tyr Arg
Leu Asp
985 990 995
1000

CCT CAG CTC CAG CTG CAC TGC TCA GAC GAG ATC TCC AGT CTA TGT GCT GAA GAA
GCA GCA 3089
Pro Gln Leu Gln Leu His Cys Ser Asp Glu Ile Ser Ser Leu Cys Ala Glu Glu
Ala Ala
1005 1010 1015
1020

GCC CAA GAG CAG ACA GGT CAG GTG GAG GAG TGC CTC AAG GTC AAC CTG CTC AAG
ATC AAA 3149
Ala Gln Glu Gln Thr Gly Gln Val Glu Glu Cys Leu Lys Val Asn Leu Leu Lys
Ile Lys
1025 1030 1035
1040

ACA GAA TTG TGT AAA AAG GAA GTG CTA AAC ATG CTG AAG GAA AGC AAA GCA GAC
ATC TTT 3209
Thr Glu Leu Cys Lys Lys Glu Val Leu Asn Met Leu Lys Glu Ser Lys Ala Asp
Ile Phe
1045 1050 1055
1060

GTT GAC CCG GTA CTT CAT ACT GCT TGT GCC CTG GAC ATT AAA CAC CAC TGC GCA
GCC ATC 3269
Val Asp Pro Val Leu His Thr Ala Cys Ala Leu Asp Ile Lys His His Cys Ala
Ala Ile
1065 1070 1075
1080

ACC CCT GGC CGC GGG CGT CAA ATG TCC TGT CTC ATG GAA GCA CTG GAG GAT AAG
CGG GTG 3329
Thr Pro Gly Arg Gly Arg Gln Met Ser Cys Leu Met Glu Ala Leu Glu Asp Lys
Arg Val
1085 1090 1095
1100

AGG TTA CAG CCC GAG TGC AAA AAG CGC CTC AAT GAC CGG ATT GAG ATG TGG AGT
TAC GCA 3389
Arg Leu Gln Pro Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asn Asp Arg Ile Glu Met Trp Ser
Tyr Ala
1105 1110 1115
1120

GCA AAG GTG GCC CCA GCA GAT GGC TTC TCT GAT CTT GCC ATG CAA GTA ATG ACG
TCT CCA 3449
Ala Lys Val Ala Pro Ala Asp Gly Phe Ser Asp Leu Ala Met Gln Val Met Thr
Ser Pro
1125 1130 1135
1140

TCT AAG AAC TAC ATT CTC TCT GTG ATC AGT GGG AGC ATC TGT ATA TTG TTC CTG
ATT GGC 3509
Ser Lys Asn Tyr Ile Leu Ser Val Ile Ser Gly Ser Ile Cys Ile Leu Phe Leu
Ile Gly
1145 1150 1155
1160

CTG ATG TGT GGA CGG ATC ACC AAG CGA GTG ACA CGA GAG CTC AAG GAC AGG TAG
3563
Leu Met Cys Gly Arg Ile Thr Lys Arg Val Thr Arg Glu Leu Lys A Asp Arg

1165 1170 1175 1179